



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



SÍNTESIS QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y MODO DE ACCIÓN DE LA NEUROSTATINA Y SUS ANÁLOGOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE GLIOMAS

TESIS DOCTORAL

BEATRIZ VALLE ARGOS

MADRID 2010



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



SÍNTESIS QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y MODO DE ACCIÓN DE LA NEUROSTATINA Y SUS ANÁLOGOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE GLIOMAS

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias que presenta

BEATRIZ VALLE ARGOS

Realizada en el Instituto Cajal (CSIC) bajo la dirección del
Dr. Manuel Nieto Sampedro y el Dr. Diego Gómez Nicola

Vº Bueno del Director

Vº Bueno del Co-Director

Manuel Nieto Sampedro

Diego Gómez Nicola

Vº Bueno del Tutor

La interesada

Francisco Zafra Gómez

Beatriz Valle Argos

MADRID 2010

MANUEL NIETO SAMPEDRO, Profesor de Investigación del Instituto Cajal, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INFORMA

Que la presente tesis doctoral titulada "Síntesis química, actividad antitumoral y modo de acción de la neurostatina y sus análogos sobre el crecimiento de gliomas" ha sido realizada bajo mi dirección por BEATRIZ VALLE ARGOS, en el Laboratorio de Plasticidad Neural, del Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas, del Instituto Cajal (CSIC), estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, firmo la presente autorización en Madrid, Enero de 2010

DIEGO GÓMEZ NICOLA, Doctor Contratado del Hospital Nacional de Paraplégicos del Servicio de Salud de Castilla la Mancha

INFORMA:

Que la presente tesis doctoral titulada "Síntesis química, actividad antitumoral y modo de acción de la neurostatina y sus análogos sobre el crecimiento de gliomas" ha sido realizada bajo mi dirección por BEATRIZ VALLE ARGOS, en el Laboratorio de Plasticidad Neural, del Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas, del Instituto Cajal (CSIC), estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada y defendida públicamente para optar al grado de Doctor.

Y para que conste, firmo la presente autorización en Madrid, Enero de 2010

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	5
1. TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE LOS GLIOMAS.....	6
1.1. Los gliomas. Clasificación y características.....	7
1.2. El ciclo celular en los gliomas.....	9
1.2.1. El ciclo celular.....	9
1.2.2. Mecanismos de control del ciclo celular.....	10
<i>Inhibidores de la progresión del ciclo celular</i>	11
1.2.3. Alteraciones en la regulación del ciclo celular en los gliomas.....	13
<i>Mutaciones en la vía de Rb</i>	13
<i>Mutaciones en la vía de p53</i>	13
1.3. Control extracelular del ciclo celular.....	14
1.3.1. Regulación de la proliferación por factores de crecimiento.....	14
1.3.2. Función del receptor del factor de crecimiento epidérmico en la proliferación.....	16
<i>La vía de las MAPKs ERK y el control del ciclo celular</i>	17
<i>La vía de la PI3K/Akt y el control del ciclo celular</i>	18
<i>La vía de STAT</i>	19
1.3.3. Función del receptor del factor de crecimiento epidérmico en gliomas.....	19
<i>Alteraciones en las vías de señalización activadas por EGFR en gliomas</i>	20
1.4. Muerte celular por apoptosis en los gliomas.....	21
1.5. Regulación de la función inmune en gliomas.....	22
1.6. Terapias y tratamientos actuales de los gliomas.....	23
<i>El receptor del factor de crecimiento epidérmico como diana terapéutica en gliomas</i>	24
2. LOS GANGLIÓSIDOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: PAPEL EN LA PATOLOGÍA TUMORAL.....	25
2.1. Estructura y clasificación de los gangliósidos.....	25
2.2. Los gangliósidos en el sistema nervioso central.....	27
2.2.1. Funciones de los gangliósidos en el sistema nervioso central.....	28
<i>Modulación de la respuesta a factores de crecimiento por gangliósidos</i>	29
2.3. Expresión y función de los gangliósidos en los gliomas.....	30
2.4. Los gangliósidos O-acetilados en el SNC y en los gliomas.....	31
2.5. La neurostatina.....	32
2.5.1. Estudios previos.....	33
2.5.2. Métodos de obtención de la neurostatina y sus gangliósidos derivados.....	35
OBJETIVOS.....	37

MATERIALES y MÉTODOS.....	39
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	40
2. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.....	40
2.1. Método de O-acetilación y O-butilación química de gangliósidos.....	40
<i>O-Acetilación y O-Butirilación química de GD1b</i>	40
<i>Desalado de las muestras</i>	40
2.2. Técnicas cromatográficas.....	41
<i>Cromatografía en capa fina (TLC)</i>	41
<i>Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)</i>	41
2.3. Técnicas de análisis molecular.....	42
<i>Espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI TOF-TOF)</i>	42
<i>Electrospray-MS</i>	42
<i>Hidrólisis Alcalina</i>	43
3. TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES.....	43
3.1. Cultivo de líneas tumorales.....	43
3.2. Cultivo de astroblastos de corteza postnatales.....	43
3.3. Cultivo de neuronas de corteza embrionarias.....	44
4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	44
4.1. Transfección de la línea de glioma de rata (C6).....	44
4.2. Evaluación de la proliferación celular por el método de reducción de MTT.....	45
4.3. Evaluación de la supervivencia neuronal por el método de reducción de MTT.....	46
4.4. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	47
5. MODELOS EXPERIMENTALES TUMORALES EN ANIMALES.....	47
5.1. Xenotransplantes de tumores en ratones Foxn1nu/nu.....	47
<i>Tratamiento agudo de xenotransplantes de glioma de rata</i>	48
5.2. Alotransplantes intra-estriatales de glioma de rata.....	48
6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	49
6.1. Inmunodetección de proteínas.....	49
<i>Obtención de muestras de proteína de células en cultivo</i>	49
<i>Obtención de muestras de proteína de tejido fresco</i>	50
<i>Electroforesis de proteínas, transferencia a nitrocelulosa e inmunodetección (Western blot)</i>	50
6.2. Análisis de la expresión génica mediante arrays de PCR.....	53
<i>Obtención de muestras de ARNm y control de calidad</i>	53
<i>Obtención de ADNc y cuantificación de la expresión génica mediante Arrays de PCR</i>	53
7. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS.....	54
7.1. Método de tinción inmunocitoquímica.....	54
7.2. Método de tinción inmunohistoquímica.....	55
<i>Perfusión de los animales, procesamiento de las muestras y obtención de secciones de tejido</i>	55
<i>Método general de marcaje inmunohistoquímico: inmunofluorescencia y revelado con DAB</i>	55

<i>Método específico de marcaje inmunohistoquímico de BrdU</i>	57
7.3. Procesado de imágenes	57
7.4. Métodos de cuantificación y análisis	58
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	58
RESULTADOS	60
1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS GLICOLIPÍDICOS DE GD1b	61
1.1. Síntesis de derivados acetilados o butirilados de GD1b	61
1.1.1. Reacciones de O-sustitución de gangliósidos: antecedentes	61
1.1.2. Condiciones generales de síntesis de derivados O-acetilados mono-sustituídos	62
1.1.3. Aislamiento de compuestos obtenidos mediante O-acetilación química de GD1b	63
1.1.4. Aislamiento de compuestos obtenidos mediante O-butilación química de GD1b	64
1.2. Caracterización de los derivados O-sustituídos de GD1b	65
1.2.1. Caracterización de los derivados O-acetilados de GD1b (Compuestos 2, 3, 4 y 5)	66
<i>Determinación del número de O-acetilaciones en la estructura de los compuestos 2, 3, 4 y 5</i>	66
<i>Determinación de la posición de las O-acetilaciones en la estructura de los compuestos 2, 3, 4 y 5</i>	67
1.2.2. Caracterización de los derivados O-butilados de GD1b (Compuestos 6, 7, 8 y 9)	70
<i>Determinación del número de O-acetilaciones en la estructura de los compuestos 6, 7, 8 y 9</i>	70
<i>Determinación de la posición de las O-butilaciones en la estructura de los compuestos 6, 7, 8 y 9</i>	71
1.3. Condiciones de reacción de O-sustitución química específicas de cada compuesto	74
2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TUMORAL DE LOS GANGLIÓSIDOS SEMI-SINTÉTICOS DERIVADOS DE LA NEUROSTATINA	77
2.1. Actividad anti-tumoral <i>in vitro</i>	77
2.1.1. Actividad anti-tumoral de los derivados semi-sintéticos de la neurostatina	77
2.1.2. Evaluación de la estabilidad de los compuestos	79
2.1.3. Efecto de la neurostatina y de O-But GD1b sobre la progresión del ciclo celular	80
2.1.4. Evaluación de la toxicidad de la neurostatina y de O-But GD1b	82
2.2. Actividad <i>in vivo</i> de la neurostatina y O-But GD1b sobre el crecimiento de xenotransplantes de gliomas	83
2.2.1. Diseño experimental del tratamiento de xenotransplantes de gliomas	83
<i>Actividad anti-tumoral de la neurostatina y de O-But GD1b en xenotransplantes de células de astrocitoma humano U373MG</i>	83
<i>Actividad anti-tumoral de la neurostatina y de O-But GD1b en xenotransplantes de células de glioma de rata C6</i>	85
2.2.2. Efecto de la neurostatina y de O-But GD1b sobre la proliferación y la progresión del ciclo celular en xenotransplantes de glioma C6	87
2.3. Actividad <i>in-vivo</i> de la neurostatina y O-But GD1b sobre el crecimiento de alotransplantes intracraneales de glioma de rata C6	90
2.3.1. Efecto de la neurostatina y de O-But GD1b sobre el crecimiento de alotransplantes intracraneales de glioma de rata C6	90
2.3.2. Actividad anti-proliferativa y pro-apoptótica de la neurostatina y de O-But GD1b sobre gliomas de rata C6	92

2.3.3. Efecto de la neurostatina y O-But GD1b sobre la regulación de la infiltración inmune en gliomas intracraneales C6	93
3. MECANISMO DE ACCIÓN ANTI-TUMORAL DE LA NEUROSTATINA.....	95
3.1. Efecto del la neurostatina sobre la progresión del ciclo celular de las células tumorales.....	95
3.1.1. La división celular de las células tumorales es inhibida por la neurostatina	95
3.1.2. Efecto de la neurostatina sobre la progresión del ciclo celular	97
<i>El tratamiento con neurostatina reduce los niveles de los complejos Ciclina-CDK</i>	97
<i>La neurostatina aumenta la expresión de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27</i>	99
<i>La neurostatina aumenta la inactivación de la proteína retinoblastoma (Rb)</i>	100
3.2. Efecto de la neurostatina sobre la activación del receptor de EGF y la vía de señalización de las MAPKs.....	102
3.2.1. La neurostatina inhibe la activación del receptor de EGF (EGFR)	102
3.2.2. La neurostatina inhibe la activación de Shc y ERK 1 y ERK 2	104
3.3. Efecto de la neurostatina sobre la expresión génica de los reguladores de la biología tumoral.....	105
DISCUSIÓN.....	109
1. SÍNTESIS DE NEUROSTATINA Y SUS DERIVADOS: RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN.....	110
2. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA NEUROSTATINA Y O-BUT GD1b.....	113
3. MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DE LA NEUROSTATINA Y O-BUT GD1b.....	117
<i>Inhibición de la progresión del ciclo celular</i>	117
<i>Inhibición de la activación de EGFR y sus vías de señalización intracelular</i>	121
CONCLUSIONES.....	127
BIBLIOGRAFÍA.....	130
ANEXO I	I
Figura suplementaria 1.....	II
Tabla suplementaria 1.....	III
Tabla suplementaria 2.....	IV
ANEXO II (Publicaciones científicas)	VII

Valle-Argos B, Gómez-Nicola D, Nieto-Sampedro M. (2010). Synthesis and characterization of Neurostatin-related compounds with high inhibitory activity of glioma growth. Eur J Med Chem (aceptado-en prensa).

Gomez-Nicola D, **Valle-Argos B**, Pita-Thomas DW, Nieto-Sampedro M (2008) Interleukin 15 expression in the CNS: Blockade of its activity prevents glial activation after an inflammatory injury. Glia 56:494-505.

Gómez-Nicola D, **Valle-Argos B**, Suardíaz M, Taylor JS, Nieto-Sampedro M. (2008) Role of IL-15 in spinal cord and sciatic nerve after chronic constriction injury: regulation of macrophage and T-cell infiltration. J

Neurochem 107(6):1741-1752.

Gómez-Nicola D, **Valle-Argos B**, Nieto-Sampedro M. (2010). Blockade of IL-15 activity inhibits microglial activation through the NFkB, p38 and ERK1/2 pathways, reducing cytokine and chemokine release. *Glia*. 58(3): 264-276.

CD ROM en contraportada con Tesis Doctoral en formato digital

ABREVIATURAS

ABC	Complejo avidina-biotina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína quinasa B
ANGPT2	Angiopietina 2
ANOVA	Análisis de la varianza
AP-1	Proteína activadora 1
APC	Célula presentadora de antígen
ARF	Factor de la ribosilación de ADP
ARN	Ácido ribonucleic
ATM	Ataxia telantegtasia mutado
BAD	Promotor de muerte asociado a Bcl-2
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2
BCL-2	Linfoma CLL 2 de células B
BCL-XL	Proteína similar a Bcl-2 1
BRD-U	5-bromo-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CDC-2	Ciclina dependiente de quinasa 2
CDC-25A	Fosfatasa del ciclo de división celular 25A
CDK-2, 4, 6	Quinasa dependiente de ciclina -2, 4, 6
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
E2F	Factor de transcripción E2F
EDTA	Ácido etilediaminotetracético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELK 1	Factor de transcripción de la familia ETS
ERB-1, 2, 3, 4	Proteína de la familia del receptor de EGF -1, 2, 3, 4
ERI	Inhibidor relacionado con EGFR
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
ETS-1	Factor de transcripción ETS
FAK	Quinasa de adhesión focal
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FGFR	Receptor del factor de crecimiento fibroblástico
GAL-T	Galactosiltransferasa
GALNAC-T	N-acetilgalactosaminiltransferasa
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GDP	Guanina di-fosfato
GFAP	Proteína fibrilar ácida glial
GFP	Proteína verde fluorescente
GLU-T	Glucosiltransferasa
GRB-1, 2	Proteína unida a receptores de factores de crecimiento 2
GSK-3β	Glucógeno sintasa quinasa 3β
GTP	Guanina tri-fosfato
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HRP	Peroxidasa de rábano picante
ID50	Dosis inhibitoria 50

IGF	Factor de crecimiento de tipo insulínico
IGFR	Receptor del factor de crecimiento de tipo insulínico
IL-2, 6, 8, 10, 15	Interlequinas 2,6, 8, 10, 15
JAK	Quinasa Janus
JNK	Quinasa Jun
MALDI-TOF	Espectrometría de masas en tiempo de vuelo
MAPK	Proteínas quinasa activadas por mitógenos
MDM-2	Oncogen murine double minute 2
MEK	Quinasa regulada por señales extracelulares o mitógenos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMP	Metaloproteinasa de tejido
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromide
NF-1	Supresor tumoral neurofibrosarcoma 1
NFκB	Factor nuclear kappa B
OMS	Organización mundial de la salud
P15, P16, P18, P19	Inhibidores del ciclo celular de la familia INK
P21, P27, P57	Inhibidores del ciclo celular de la familia Cip/Kip
P53	Supresor tumoral de 53Kd
PBS	Tampón fosfato salino
PBST	Tampón fosfato salino con tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PHH3	Fosfo histona H3
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PKC	Proteína quinasa C
PLAU	Proteína activadora de plasminógeno
PLC-γ	Fosfolipasa Cγ
PTB	Dominio de unión a fosfotirosinas
PTEN	Proteína homóloga de la fosfatasa y la tensina
RAF	Homólogo 1 del oncogen de leucemia viral murina v-raf-1
RAS	Familia de oncogenes cuyo nombre se deriva de sarcoma de rata
RB	Retinoblastoma
RF	Factor de retención en TLC
RHOA	GTPasa de la familia Rho
SDS	Sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SERPINB5	Serpina B5
SFB	Suero fetal bovino
SH2	Dominio de unión homólogo a Src
SHC	Proteína homóloga a Src y similar a colágeno
SNC	Sistema nervioso central
SOS	Homólogo 1 de "son of sevenless"
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
SYK	Tirosina quinasa de bazo
TBST	Tampón tris salino con tween-20
TGFα	Factor de crecimiento transformante alfa
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TIMP	Inhibidor de metaloproteinasas de tejido

TLC	Cromatografía en capa fina
TMOA	Trimetilortoacetato
TMOB	Trimetilortobutirato
TMZ	Temozolamida
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento vascular y epitelial
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento vascular y epitelial

ABSTRACT

In spite of their low incidence, the central nervous system tumors are responsible of about 2,3% of total cancer deaths; these tumors have an elevated morbidity and mortality. Unless several molecular targets have been described to attack glioma growth, the therapeutic strategies remain partially ineffective. The ganglioside 9-O-Ac-GD1b or neurostatin, present in the mammalian brain, is a potent astroblast and astrocytoma cell division inhibitor, appearing as a possible candidate for treatment of nervous system tumours. Because the purification of neurostatin from brain is highly laborious, we designed its preparation by chemical O-acetylation of GD1b. Moreover, searching for a more stable compound with higher inhibitory activity, we also tested O-butyrylation or multi-O-substitution of GD1b.

The semi-synthetic compounds efficiently inhibited the *in-vitro* division of rat and human glioma cells (C6 and U373 cell lines), with no toxic effect over neural cells. Growth inhibition in culture correlated with inhibition of the growth of xenotransplants of both rat and human glioma cells (C6 and U373) in Foxn1^{nu/nu} nude mice and allotransplants of C6 cells in the striatum of Sprague-Dawley rats. Neurostatin and O-But GD1b efficiently inhibited the *in vivo* cell cycle progression of glioma cells, reducing its proliferation, and induced apoptosis of intracranial gliomas. Additionally, intracranial gliomas, when treated with the compounds, were infiltrated of immune cells, to collaborate to resume the tumor.

The molecular mechanisms of growth inhibition of neurostatin were also assessed. Using an *in vitro* model of human glioma cells (U373MG), we observed that neurostatin inhibited the expression of the cyclins and CDK's that control cell cycle progression and increased the expression of the inhibitors p21 and p27, further blockin Rb inactivation. The main consequence of neurostatin action was the arrest of the glioma cell cycle in G₁, as evidenced by flow cytometry, western blotting and PCR arrays techniques. These effects were exerted through the inhibition of the epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and the consequent blockade of its intracellular signalling pathways, like the MAPKs or PI3K, the main regulatory pathways of tumor cell growth. The overall effect of neurostatin over glioma cells, analyzed by PCR arrays, was the regulation of the expression of the proteins responsible of the control of proliferation, angiogenesis, invasion, metastasis or apoptosis, key mechanisms determining the tumor final growth.

The results presented here indicate that semi-synthetic O-acetylated and O-butyrylated GD1b derivatives (neurostatin and O-But GD1b) are potent antitumoral compounds that block glioma cells growth, angiogenesis and invasion, also inducing its apoptosis, making them potential strategies for brain tumor treatment.

INTRODUCCIÓN

1. TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE LOS GLIOMAS

El cáncer, o neoplasia maligna, es un conjunto de enfermedades caracterizadas por presentar células con crecimiento incontrolado y capacidad de invasión y, en ocasiones, de generar metástasis o extensión a otros tejidos. El cáncer es responsable de aproximadamente el 13% de las muertes humanas, habiendo causado 7,6 millones de muertes en 2007, según la Sociedad Americana del Cáncer (World Health Organization, 2008). La mayoría de las patologías cancerosas están provocadas por alteraciones genéticas, tales como cambios en la secuencia de ADN, aberraciones en el número de copias, reordenamientos cromosómicos o modificaciones en la metilación del ADN, que conducen al desarrollo y progresión de procesos tumorales en humanos (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Estas alteraciones pueden ser producidas por sustancias carcinógenas, como el humo del tabaco, la radiación, agentes químicos o agentes infecciosos. Otras alteraciones que conducen al cáncer pueden ser, sin embargo, heredables y radicar en la información genética del individuo.

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias, con comportamiento y pronóstico diferentes, que aparecen como consecuencia de la proliferación desordenada e incontrolada de las células fenotípicamente distintas, que lo constituyen, así como de sus vasos y sus envolturas protectoras. Los tumores cerebrales no son comunes si se comparan con otros tipos de cáncer, constituyendo aproximadamente un 1,4% del total de los tumores. En España, los tumores primarios del SNC representan un 2% del total del cáncer en el adulto, y un 19% en los niños menores de 15 años (Sociedad Española de Oncología Médica, 2009). Pero, a pesar de la reducida tasa de los tumores cerebrales, la morbilidad y la mortalidad que presentan en la población es altamente significativa, en comparación con tumores más frecuentes como el de colon, pulmón o mama, produciendo el 2,3% de las muertes directamente causadas por cáncer.

A pesar de la abundante literatura existente sobre el tema, la clasificación de los tumores cerebrales es compleja. La dificultad en la clasificación depende fundamentalmente de la diversidad celular del SNC (neuronas, astrocitos, oligodendroglía, células epéndimales, tejido conjuntivo, microglía, vasos sanguíneos, etc.), siendo cada una de las estirpes celulares un potencial origen de neoplasias. Los tumores cerebrales reciben el nombre en función de la célula en la que se originan. La clasificación más aceptada es la propuesta por la Organización Mundial de la Salud (Louis y cols., 2007a), en la cual se incluyen tumores neuroepiteliales (astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas, meduloblastomas y retinoblastomas), tumores de los nervios craneales o espinales (neurofibromas y schwannomas), tumores de las meninges (meningiomas y lipomas), neoplasias hematopoyéticas, tumores de células germinales, lesiones pseudotumorales y quísticas, tumores de la hipófisis anterior, extensiones locales de tumores regionales (cordomas) y metástasis tumorales. Dentro de los tumores de origen neuroepitelial se encuentran los tumores astrocíticos, de los cuales los glioblastomas son los tumores cerebrales más

frecuentes. Las neoplasias gliales se caracterizan por su heterogeneidad, con aparición de lesiones mixtas tanto en el grado de diferenciación de sus componentes celulares como en las estirpes, dando lugar a oligoastrocitomas o tumores mixtos.

El crecimiento de algunos tumores, como los neurinomas o los meningiomas, se encuentra muy bien delimitado con respecto a los tejidos que los rodean. Sin embargo, otros tumores crecen infiltrándose en los tejidos o en las zonas adyacentes, sin que se pueda establecer un límite bien definido, como es el caso de los gliomas. La característica general de todos los tumores cerebrales es su elevada capacidad de crecimiento, comprimiendo, desplazando o invadiendo los centros o vías nerviosas vecinas. La evolución del crecimiento de los tumores produce, por tanto, una serie de lesiones o fallos en determinadas funciones hasta comprometer estructuras vitales, que pueden conducir incluso a la muerte. Cada tipo tumoral tiene diferentes características, tanto por su localización como por su comportamiento, con grandes variaciones entre unos y otros, y principalmente en lo referente a su velocidad de crecimiento. Sin embargo, las neoplasias malignas en el SNC no producen metástasis, lo cual constituye un hecho excepcional. Por el contrario, otras neoplasias metastatizan en el SNC, proviniendo, en orden de frecuencia, del pulmón, mama, piel, riñón y aparato gastrointestinal, y tendiendo a crecer entre la unión de la corteza cerebral y la sustancia blanca.

1.1. Los gliomas. Clasificación y características

Dentro de los tumores cerebrales, los más frecuentes son los denominados gliomas, que corresponden a tumores neuroepiteliales procedentes de las células gliales. Estos tumores son clasificados, según la OMS, en una escala del I al IV dependiendo del grado de malignidad (Fig. 1), juzgado por características histológicas junto con alteraciones genéticas (Louis y cols., 2007b). Los tumores de grado I, también llamados astrocitomas pilocíticos, presentan un pronóstico favorable debido a la falta de infiltración tumoral en el parénquima cerebral, a la facilidad de su resección y a su crecimiento lento (Fig. 1). Los tumores de grado II son tumores de grado bajo y pueden seguir cursos clínicos largos, pero la infiltración temprana y difusa del cerebro circundante los transforma en incurables mediante cirugía (Fig. 1). Los tumores de grado III o astrocitomas anaplásicos, muestran un incremento en anaplasia (regresión a un estado menos diferenciado) y proliferación, y rápidamente se convierten en fatales (Fig. 1). Los tumores de grado IV o glioblastomas multiformes (Fig. 1) tienen características de malignidad más avanzadas, incluyendo proliferación vascular (angiogénesis) y necrosis, son resistentes a la radioterapia y a la quimioterapia y son generalmente letales antes de 12 meses (Furnari y cols., 2007).

Los glioblastomas de grado IV o multiformes constituyen el tipo de neoplasia cerebral más frecuente y maligna. Se presentan con una frecuencia de 3 casos nuevos anuales por cada 100000 habitantes, en la mayor parte de los países europeos y en Estados Unidos. Los glioblastomas multiformes se subdividen en primarios y secundarios (Louis y cols., 2007b). Los glioblastomas primarios se forman de novo, se desarrollan rápidamente y presentan una

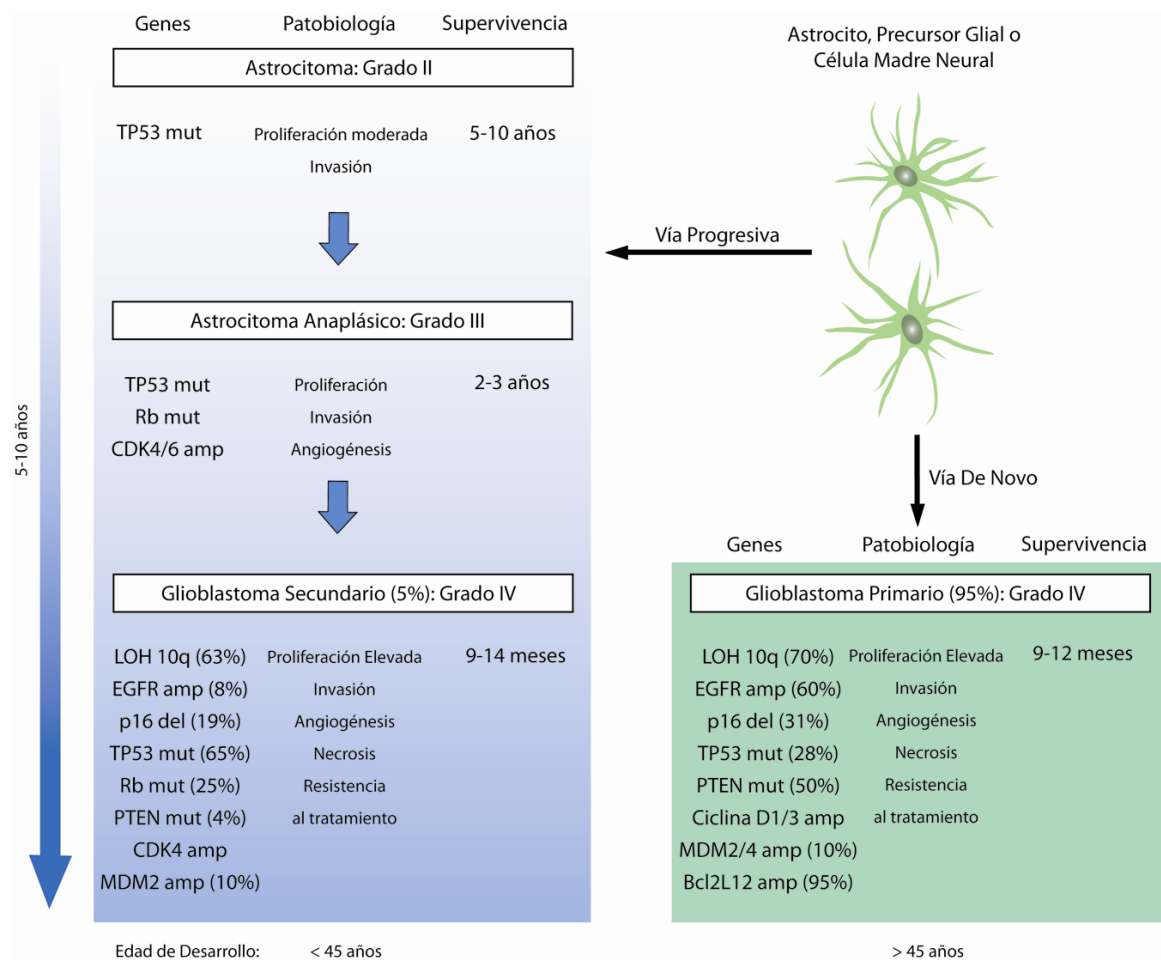


Figura 1. Modificaciones genéticas implicadas en la génesis de los glioblastomas.

Relación entre la supervivencia, patobiología y modificaciones génicas que llevan a la formación de glioblastomas primarios (de novo) o secundarios (a partir de astrocitomas de grado bajo). Los glioblastomas secundarios se forman a partir de la progresión, y acumulación de mutaciones, de los astrocitomas de grado II y III a lo largo de 5-10 años, convirtiéndose en altamente malignos y resistentes al tratamiento, con una tasa de supervivencia de 9 a 14 meses. Las mutaciones más frecuentes son la pérdida de la heterocigosidad del cromosoma 10 y la mutación de TP53. Los glioblastomas primarios suponen el 95% y son igualmente malignos y resistentes al tratamiento, con una tasa de supervivencia de 9 a 12 meses. Se caracterizan por la amplificación de EGFR y Bcl2L2, la mutación de PTEN y la pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10. Estos dos tipos de gliomas de grado IV ocurren en grupos de edad diferentes y presentan alteraciones génicas diferentes que afectan a vías moleculares similares. Mut- mutación; amp- amplificación; del- delección; (%) porcentaje de frecuencia en que aparecen las mutaciones. Modificado de (Furnari y cols., 2007; Ohgaki y Kleihues, 2007).

historia clínica de corta duración. No proceden de tumores de grado inferior, y suponen alrededor del 95% de los glioblastomas multiformes diagnosticados (Fig. 1). Los gliomas secundarios proceden de la progresiva transformación de los astrocitomas de grado II y III. El

70% de los gliomas de grado II se transforman en gliomas de grado III y IV a los 5-10 años del diagnóstico (Ohgaki y Kleihues, 2007). Estos subtipos de glioblastomas constituyen dos entidades clínicas diferentes, que se manifiestan en pacientes con edad diferente y se desarrollan mediante rutas génicas distintas (Fig. 1). Los glioblastomas primarios se presentan en pacientes de mayor edad, como media a los 60 años, y se caracterizan por la pérdida de la heterocigosidad del cromosoma 10q (70% de los casos), amplificaciones del receptor de EGF (EGFR; 36% de los casos), delección de p16 (31% de los casos), y mutaciones en PTEN (25% de los casos). Por el contrario, los glioblastomas secundarios se presentan en pacientes más jóvenes, menores de 45 años, y van acumulando diferentes alteraciones génicas (Fig. 1) como la mutación de p53 (65% de los casos), seguida de la mutación de la proteína de retinoblastoma (Rb), la amplificación de Mdm2 y CDK4 (Besson y Yong, 2001) y la pérdida de heterocigosidad del cromosoma 10q (alrededor de 63% de los casos), siendo la mutación genética más frecuente en ambos glioblastomas, primarios y secundarios (Maher y cols., 2006; Tso y cols., 2006).

En la actualidad se están identificando nuevas alteraciones genéticas presentes en los glioblastomas que, unidas a las ya conocidas, definen una batería de genes alterados en estos tipos de tumores, donde destacan, TP53, EGFR, PTEN, NF1, RB1, PIK3CA, PIK3R1, CKDN2A, CDK4 e IDH1 (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Parsons y cols., 2008).

1.2. El ciclo celular en los gliomas

1.2.1. El ciclo celular

El ciclo celular es el proceso mediante el cual las células del organismo se dividen. Este proceso se encuentra altamente regulado para que las células se dividan exclusivamente cuando es necesario. La pérdida del control sobre la división celular puede dar origen a un tumor, y si se adquiere la capacidad de invadir el tejido circundante se generan tumores malignos. De este modo, los tumores presentan alteraciones génicas que afectan a la proliferación y supervivencia celular, a la invasión y a la angiogénesis.

El ciclo celular es un proceso esencial en el desarrollo, diferenciación y proliferación de las células. La progresión a través del ciclo celular depende de la presencia de factores de crecimiento y de la adhesión celular. Mientras los factores de crecimiento se mantengan en el microambiente celular, la mayoría de las células adherentes continuaran dividiéndose. En ausencia de factores de crecimiento las células dejarán de dividirse y entran en fase de quiescencia. (Hulleman y Boonstra, 2001). La progresión del ciclo celular está controlada por la activación y desactivación de diversas proteínas, cuya desregulación implica la división constitutiva y la formación de tumores (Wang y cols., 2009). El ciclo celular está dividido en cuatro fases (Fig. 2): G₁ (gap 1), fase S (síntesis de ADN), G₂ (gap 2) y fase M (mitosis). Cuando la célula se encuentra fuera del ciclo, en fase quiescente (G₀; Fig. 2), mantiene un metabolismo muy activo, pudiendo recibir un estímulo para volver a dividirse, entrando en

fase G_1 (Collins y Garrett, 2005). La fase G_1 es una fase preparatoria, en la que se generan las enzimas necesarias para la síntesis de ADN y se produce un aumento de la masa celular previo a la división. En la fase S o de síntesis la célula duplica su material génico y en la fase G_2 la célula se prepara para la división (Fig. 2). Esta, finalmente ocurre en la fase de mitosis (M), donde se reparte el material génico duplicado entre las células hijas.

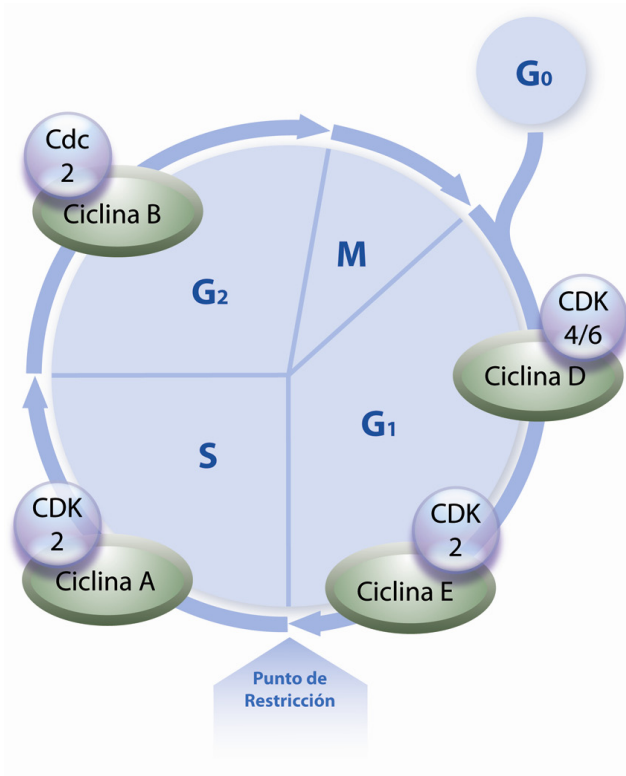


Figura 2. Expresión de ciclinas-CDKs durante la progresión del ciclo celular.

Esquematización de la expresión de los diferentes complejos ciclina-CDKs a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular: G_1 (gap 1), S (síntesis de ADN), G_2 (gap 2) y M (mitosis). Las células quiescentes que se encuentran fuera del ciclo de división, están en fase G_0 . El punto de restricción (R) es el punto de control más importante del ciclo celular y determina la transición de G_1 a S.

1.2.2. Mecanismos de control del ciclo celular

La progresión del ciclo celular está fuertemente regulada en varios puntos de control, que aseguran el completo desarrollo de cada fase antes de proceder a la siguiente. En las células de mamíferos, las transiciones del ciclo celular se encuentran controladas por la expresión de las ciclinas, proteínas que se unen a quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) formando complejos activos (Fig. 2). Las ciclinas se van sintetizando y degradando a medida que avanza el ciclo celular.

La transición entre la finalización de la fase G_1 y el inicio de la fase S está regulada en el denominado punto de restricción (R), que determina si la célula pasa irrevocablemente a fase de síntesis (Fig. 2, Fig. 3), independientemente de la presencia o ausencia de estímulo extracelular (Pardee, 1989). Este punto de restricción (Fig. 2, Fig. 3) está controlado por ciclinas de tipo D (D1, D2 y D3), que se unen a CDK4 y CDK6 (Schwartz y Shah, 2005). La expresión de las ciclinas D depende de la estimulación por factores de crecimiento (Fig. 3), aumentando en la fase G_1 e interaccionando con CDK4 y CDK6, formando complejos que interactúan con la proteína de retinoblastoma (Rb; Fig. 3) en la mitad de la fase G_1 (Sherr,

1996). Cuando Rb se encuentra de-fosforilada se acompleja con los factores de transcripción E2F, bloqueando la transcripción de los genes necesarios para la progresión del ciclo (Fig. 3). Cuando Rb es fosforilada progresivamente por los complejos ciclina D-CDK4/6 se libera el factor de transcripción E2F (Fig. 3), estimulando la síntesis de CDK2, ciclina E y de proteínas necesarias para la síntesis de ADN (Mittnacht y cols., 1994). La expresión de la ciclina E es necesaria para la transición a la fase S (Ohtsubo y cols., 1995), aumentando sus niveles al final de la fase G₁ y uniéndose a CDK2. Los complejos ciclina E-CDK2 son necesarios para el progreso de G₁ a S (Fig. 3), encargándose también de inactivar Rb y favorecer la acción de E2F (Kitagawa y cols., 1996). Una vez que las células entran en fase S (Fig. 2), se silencia la actividad de los complejos ciclina E-CDK2, mediante la degradación de la ciclina E, con el fin de detener la replicación del ADN (Malumbres y Barbacid, 2005). En ese momento CDK2 se une a la ciclina A recién sintetizada (Fig. 2), encargándose este complejo de fosforilar factores de transcripción y proteínas requeridas para completar la salida de la fase S (Fotedar y Fotedar, 1995).

Durante la fase G₂ la ciclina A es degradada y las ciclinas B (B1 y B2) son sintetizadas activamente (Fig. 2). Paralelamente, otra ciclina dependiente de quinasa, cdc2 (CDK1), se une a las ciclinas de tipo B (Fig. 2), esenciales para el desencadenamiento de la mitosis. Los niveles de ciclina B1 aumentan al final de la fase S y al inicio de la fase G₂, lo que permite la acumulación de complejos ciclina B1-cdc2 (Coqueret, 2003) que se mantiene hasta la mitosis, iniciándose la condensación de los cromosomas. La pérdida de la actividad del complejo ciclina B1-cdc2 es necesaria para la finalización de la mitosis y la completa división celular (Pines, 2006).

Las células que se encuentran en fase de quiescencia G₀, pueden recibir un estímulo que les haga entrar en el ciclo de división (Fig. 2). La estimulación se suele producir por sustancias mitogénicas, que inducen la expresión de ciclina D y la activación de toda la maquinaria del ciclo celular.

Inhibidores de la progresión del ciclo celular

La actividad de los complejos ciclina-CDK se encuentra regulada por inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs) que actúan formando complejos (Fig. 3). En células de mamíferos se han descrito dos familias de inhibidores, la familia Cip/Kip compuesta por p21^{cip1}, p27^{kip1} y p57^{kip2}, y la familia INK (inhibidores de CDK4) que incluye p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4V} y p19^{INK4D} (Sherr y Roberts, 1995; Reed, 1997). El inhibidor p21 de la familia Cip/Kip se une a diversos complejos ciclina-CDK, como ciclina D-CDK4, ciclina D-CDK6, ciclina E-CDK2 y ciclina A-CDK2 (Fig. 3), presentando mayor afinidad por los complejos de la fase G₁ (Harper y cols., 1993). La expresión de p21 puede ser inducida por el supresor tumoral p53 en respuesta a un daño en el ADN (Fig. 3). Sin embargo, la expresión de p21 puede ser inducida independientemente de p53. En muchos tipos celulares la expresión de p21 se correlaciona con procesos de diferenciación, y p21 está implicada en la salida de la célula del ciclo celular por parada en la fase G₁. La expresión de p21 disminuye ante el estímulo con mitógenos (Fig.

3)(Nourse y cols., 1994), y aumenta en presencia de diferentes señales como TGF β o la inhibición por contacto (Polyak y cols., 1994a). Por esto, se sobre-expresa en células quiescentes, disminuyendo rápidamente ante el estímulo con factores de crecimiento pasando la célula de G₀ a G₁ (Fig. 3).

Otro inhibidor relacionado estructuralmente con p21 es p27 (Toyoshima y Hunter, 1994). p27 se expresa tanto en células proliferativas como diferenciadas (Polyak y cols., 1994b; Porter y cols., 1997) y, al igual que p21, se une e inhibe a los complejos de ciclinas D y E (Fig. 3). p27 es fosforilado al final de la fase G₁ por el complejo ciclina E-CDK2 (Morisaki y cols., 1997) y degradado por la vía de la ubiquitina en la transición de G₁ a S (Pagano y cols., 1995). Tanto p21 como p27 se expresan en células en proliferación, y se ha evidenciado su

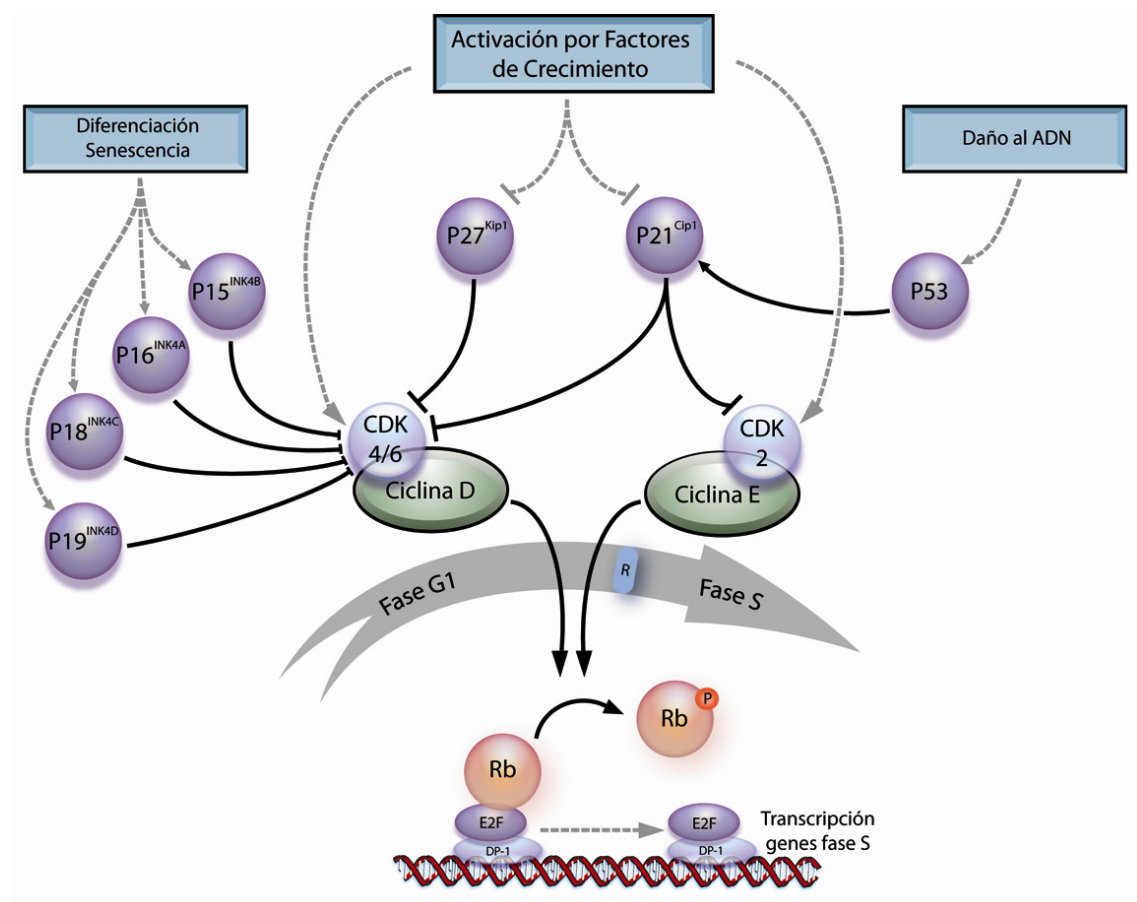


Figura 3. Factores implicados en el control de la transición de G₁ a la S.

La transición entre la fase G₁ y la fase S está regulada en el denominado punto de restricción (R), que determina el paso de la célula a la fase de síntesis. La expresión de las ciclinas D y E determina la formación de los complejos ciclina D-CDK4/6 y ciclina E-CDK2 que fosforilan a la proteína de retinoblastoma (Rb), liberando el factor de transcripción E2F, que permite la transcripción de los genes necesarios para la progresión del ciclo. Los factores de crecimiento estimulan la división celular provocando el aumento de la expresión de las ciclinas D y E, y bloqueando los inhibidores de complejos ciclina-CDK p21^{Cip1} y p27^{Kip1}. La proteína p53 bloquea la progresión del ciclo cuando se produce un daño en el ADN mediante la activación del inhibidor p21^{Cip1}. Ante señales de diferenciación y senescencia CDK4/6 son bloqueadas por los inhibidores p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} y p19^{INK4D} impidiéndose la progresión del ciclo de división.

unión a la ciclina D (Sherr y Roberts, 1999), ya que pequeñas cantidades de estos inhibidores son necesarias para la progresión del ciclo, y su capacidad inhibitoria depende de su mayor abundancia frente a los complejos ciclina-CDK (Soos y cols., 1996). El inhibidor p57, al igual que los anteriores, interacciona e inhibe varios complejos ciclina-CDK, y su sobre-expresión bloquea a la célula en G₁ (Lee y cols., 1995; Matsuoka y cols., 1995).

La segunda familia de inhibidores, que incluye a p15, p16, p18 y p19, no inhibe los complejos ciclina-CDK, sino que ejercen su acción sobre CDK4 y CDK6, impidiendo su unión a ciclinas o bloqueando su actividad quinasa (Xiong y cols., 1993; Hirai y cols., 1995) y por tanto impidiendo que las células pasen a la fase de síntesis (Fig. 3).

1.2.3. Alteraciones en la regulación del ciclo celular en los gliomas

Las células tumorales nerviosas, al igual que en el resto de sistemas, se generan debido a una desregulación del ciclo celular, evadiendo los mecanismos de control propios. Las mutaciones en los genes que controlan el ciclo celular son frecuentes en glioblastomas. Las vías de Rb y p53, que regulan el ciclo celular, son las dianas más relevantes mutadas en estos tumores. La ausencia de estos guardianes del ciclo celular hace a las células tumorales particularmente susceptibles a la división inapropiada, mediada por la activación constitutiva de la señalización por mitógenos a través de PI3K y MAPK (Furnari y cols., 2007).

Mutaciones en la vía de Rb

Los glioblastomas evitan la regulación del ciclo celular mediada por Rb a través de múltiples mutaciones. El gen Rb1, que se encuentra mutado en el 25% de los astrocitomas de grado alto y esta mutación tipifica la transición de los gliomas de grado bajo a medio (James y cols., 1988; Henson y cols., 1994). La amplificación del gen para CDK4 es responsable de la inactivación funcional de Rb en el 15% de los tumores de grado IV, siendo CDK6 también amplificada aunque con menor frecuencia (Reifenberger y cols., 1994; Costello y cols., 1997). La función de Rb se pierde frecuentemente a través de la inactivación del inhibidor p16 (Serrano y cols., 1993). P16 es un importante supresor de tumores y su función se pierde a través de múltiples mecanismos, como delección homocigótica, mutación o hipermetilación de su promotor, estando inactivo en el 31% de los gliomas primarios, el 19% de los glioblastomas secundarios y en el 90% de las líneas de glioma (Jen y cols., 1994; Costello y cols., 1996). Todo esto lleva a una desregulación del ciclo celular a nivel del punto de restricción (R; Fig. 3) y a la proliferación celular descontrolada.

Mutaciones en la vía de p53

El supresor tumoral p53 es un factor de transcripción que protege a la célula de la transformación tumoral, mediante la inducción de la parada del ciclo (Fig. 3), la senescencia o la inducción de apoptosis en respuesta a estrés como el daño en el ADN, inflamación o

hipoxia (Vousden y Lu, 2002). La proteína p53 se ha descrito como el guardián del genoma (Preusser y cols., 2006), controlando la transcripción de genes efectores. El efector mejor caracterizado es p21 (Fig. 3), inhibidor de complejos ciclina-quinasa (Harper y cols., 1993; el-Deiry y cols., 1993). A pesar de que no se han encontrado mutaciones de este gen en gliomas, su expresión está generalmente alterada por la inactividad de p53 y por señales mitogénicas. La pérdida de p53, tanto por mutaciones puntuales que impiden su unión al ADN, como por pérdida del cromosoma p17, ocurre en un 40% de los glioblastomas, siendo un evento temprano en la progresión patológica hacia glioblastoma secundario (Louis, 1994). p53 es degradada por Mdm2 (Stott y cols., 1998), cuya amplificación está presente en un 10% de los glioblastomas (Reifenberger y cols., 1993). El gen que codifica para ARF, inhibidor de la degradación de p53 mediada por Mdm2, sufre delección o mutación en el 35% de los glioblastomas, resultando en la pérdida de función de ARF y el descenso en los niveles p53. En general, el 75% de los glioblastomas tienen reducida la habilidad de morir por apoptosis inducida mediante esta vía, debido a las alteraciones relacionadas con p53 (Ichimura y cols., 2000).

1.3. Control extracelular del ciclo celular

La entrada en el ciclo celular no es un proceso autónomo de la célula, sino que requiere señales específicas que induzcan la división y proliferación celular. La proliferación celular se induce por la activación de vías de señalización mitogénicas tras la unión de factores de crecimiento, por contacto célula-célula o por el contacto con componentes de la matriz extracelular. Estas señales son transducidas intracelularmente por receptores tirosina quinasa transmembranales que, típicamente, activan las vías de señalización de las MAPK (proteínas quinasa activadas por mitógenos) y la PI3K (fosfatidil inositol 3-quinasa).

La mayoría de mitógenos controlan la tasa de división celular incidiendo en la fase G₁, liberando el control negativo del ciclo celular (Fig. 3) y permitiendo la entrada en la fase S. Muchos tipos celulares como los fibroblastos o las células epiteliales, requieren de adhesión a sustratos de matriz extracelular (fibronectina o laminina), para crecer y proliferar. De este modo, la unión de moléculas de matriz extracelular a integrinas (moléculas receptoras de matriz en la membrana celular) también activa las vías de señalización requeridas para iniciar el ciclo celular.

La malignidad progresiva de los gliomas conlleva una serie de alteraciones genéticas que, como hemos visto (Fig. 1), afectan a los reguladores de la progresión del ciclo celular (CDK4, CDK6, ciclina D1, Mdm2, p16, p14, Rb, y p53), pero también implica alteraciones que afectan a las vías de transducción de señales activadas por receptores tirosina quinasa, como son PDGF/PDGFR, FGF/FGFR, IGF/IGFR, y EGF/EGFR (Kapoor y O'Rourke, 2003).

1.3.1. Regulación de la proliferación por factores de crecimiento

Los factores de crecimiento juegan un papel fundamental, tanto en la progresión del ciclo celular, como en la génesis y formación de los gliomas. La mayoría de las células somáticas se encuentran en reposo en la fase G₀, no entrando en el ciclo hasta que reciben la señal de factores mitogénicos. En general, estos factores interaccionan con receptores tirosina-quinasa para inducir su dimerización, auto-fosforilación y generación de sitios de unión de proteínas de señalización. Este complejo activa una cascada de transducción de señales que desemboca en la regulación de la transcripción, provocando un aumento en la división celular debido a la activación de genes reguladores del ciclo y genes anti-apoptóticos. Los factores de crecimiento que están involucrados en la génesis de un glioma son los siguientes:

- *Factor de crecimiento plaquetario (PDGF)*. La familia de PDGF (A, B, C y D) transduce señales a través de sus receptores PDGFR (α y β), activando las vías de señalización de MAPK y PI3K (Claesson-Welsh, 1994). La coexpresión de PDGF y PDGFR se ha evidenciado desde los astrocitomas de grado bajo a los glioblastomas multiformes, aunque su sobre-expresión se ha observado comúnmente en astrocitomas de grado bajo asociado a la pérdida de función del supresor tumoral p53. La activación autocrina del receptor, observada en gliomas, parece ser el evento inicial que induce a los precursores neurales o a las células gliales diferenciadas a la transformación en astrocitomas de bajo grado (Westermarck y cols., 1995).
- *Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)*. La familia del factor de crecimiento fibroblástico (aFGF y bFGF), se une a las diferentes isoformas de su receptor (FGFR1-4) jugando un papel importante durante el desarrollo, regulando la proliferación y la angiogénesis. Los glioblastomas expresan niveles altos del FGFR1 (Morrison y cols., 1994), y el 90% de los astrocitomas expresan bFGF. La expresión de FGFR1 aumenta con el grado tumoral, y la expresión de FGFR2, que es abundante en el cerebro normal y en los tumores de bajo grado, va decreciendo a medida que aumenta el grado tumoral. La abundante expresión de FGF y FGFR1 en astrocitomas, implica una activación autocrina que desencadena la activación de la vías MAPK y PI3K. Además de su actividad mitogénica, bFGF promueve la migración de las células de glioma (Pedersen y cols., 1994) y tiene propiedades angiogénicas, potenciando la actividad de VEGF y HGF/HS (Asahara y cols., 1995).
- *Factor de crecimiento endotelial (VEGF)*. La familia del factor de crecimiento endotelial (VEGF), se une a dos receptores tirosina quinasa, VEGFR-1 y -2. VEGF es el factor pro-angiogénico más potente durante el desarrollo y la reparación de tejidos. Los gliomas son los tumores más vascularizados, estimulando la angiogénesis mediante la expresión de VEGF. La expresión de VEGFR-1 y -2 aumenta con el grado del glioma (Plate y cols., 1994). El aumento de la síntesis de VEGF y sus receptores está mediado por condiciones específicas que se dan en los glioblastomas, como la hipoxia o la falta de glucosa (Shweiki y cols., 1992). Estudios *in vitro* han demostrado que la secreción de VEGF esta inducida al inactivarse genes supresores de tumores como p53 y mediante factores de crecimiento como EGF, bFGF, PDGF, HGF y IGF-1 (Tsai y cols., 1995; Hamel y Westphal, 2000).
- *Factor de crecimiento de hepatocitos (SF/HGF)*. Es un heterodímero que se expresa en las células astrogiales, y se une a un receptor tirosina quinasa transmembrana llamado MET. Se

expresa tanto en los gliomas de grado bajo como en glioblastomas, mediando migración celular y estimulación de la angiogénesis en presencia de otros factores de crecimiento como son bFGF y VEGF (Koochekpour y cols., 1997).

- *Factor de crecimiento insulínico (IGF)*. Los factores de crecimiento insulínico, IGF-1 e IGF-2, a diferencia de los factores de crecimiento anteriores, circulan en el torrente circulatorio y actúan como factores endocrinos. Se pueden unir a receptores tirosina quinasa y a proteínas de unión a IGF (IGFBP) que modulan su efecto y regulan su disponibilidad. No se han descrito mutaciones en IGF o sus receptores pero se sabe que actúan como proto-oncogenes, estando activos en la mayoría de los tumores. IGF tiene leves efectos mitogénicos pero es un factor importante para la supervivencia de células tumorales. La inhibición del receptor de IGF-1 aumenta la tasa de apoptosis en células de glioma de rata C6 (Resnicoff y cols., 1995).
- *Factor de crecimiento transformante β (TGF β)*. Posee tres isoformas (TGF β 1-3), que se unen a receptores serin/treonin quinasa. En glioblastomas se expresan las tres isoformas en zonas recién vascularizadas, cerca de las zonas de necrosis o en los márgenes del tumor, aumentando la migración e invasión tumoral (Merzak y cols., 1994). TGF β 2 es un potente factor inmunosupresor, que actúa inhibiendo la proliferación de células T dependientes de IL-2 y la generación de linfocitos T citotóxicos (Fakhrai y cols., 1996).
- *Factor de crecimiento epidérmico (EGF)*. EGF provoca proliferación celular, a través de su receptor (EGFR). Este receptor y las vías de señalización que se desencadenan por su activación (Fig. 4), están comúnmente desregulados en gliomas, conduciendo al desarrollo y progresión tumoral. EGFR no solo está involucrado en proliferación, si no también en migración e invasión de las células de glioma (Lund-Johansen y cols., 1990).
- *Factor de crecimiento transformante α (TGF α)*: Es un miembro de la familia de EGF, con homología estructural con EGF del 30%. Es un potente mitógeno y ejerce su función mediante su unión a EGFR (Massague, 1983). Se expresa fuertemente en tanto gliomas humanos grado bajo como en glioblastomas, y normalmente se co-expresa con su receptor indicando la existencia de una activación autocrina (Schlegel y cols., 1990).

1.3.2. Función del receptor del factor de crecimiento epidérmico en la proliferación

Múltiples estudios histopatológicos y genéticos, junto con los nuevos estudios a gran escala de secuenciación de los genes tumorales cerebrales, han llevado a identificar cambios en EGFR y en los componentes de las vías de señalización activadas por EGF en la mayoría de los glioblastomas humanos (Furnari y cols., 2007).

EGFR es miembro de la familia de receptores tirosina quinasa ErbB compuesta por cuatro miembros: EGFR o ErbB1, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 (Hynes y Lane, 2005). EGFR puede ser activado por al menos 6 ligandos, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante α (TGF α), anfiregulina, betacelulina, HB-EGF y el factor de crecimiento viral (Khazaie y cols., 1993). EGFR es un receptor transmembranal que posee actividad quinasa intrínseca sobre residuos propios de tirosina (Fig. 4). Esta actividad quinasa

normalmente se activa cuando el ligando se une al receptor, induciendo la dimerización del mismo (Fig. 4). La activación del receptor conduce al reclutamiento de múltiples proteínas efectoras que contienen dominios SH2 o dominios de unión a fosfotirosina (PTB). Estos eventos inician varias vías de señalización intracelular (Fig. 4), como la vía de las MAPK, la de la PI3K o la de las proteínas STATs, que desembocan en la síntesis de ADN, el crecimiento celular o la invasión y metástasis en células tumorales (Lui y Grandis, 2002).

La vía de las MAPKs ERK y el control del ciclo celular

La activación de EGFR conduce a la iniciación de la vía de señalización de las MAPK, a través de la proteína Grb2 (Fig. 4). La unión de Grb2 al receptor EGFR puede ser directa (a

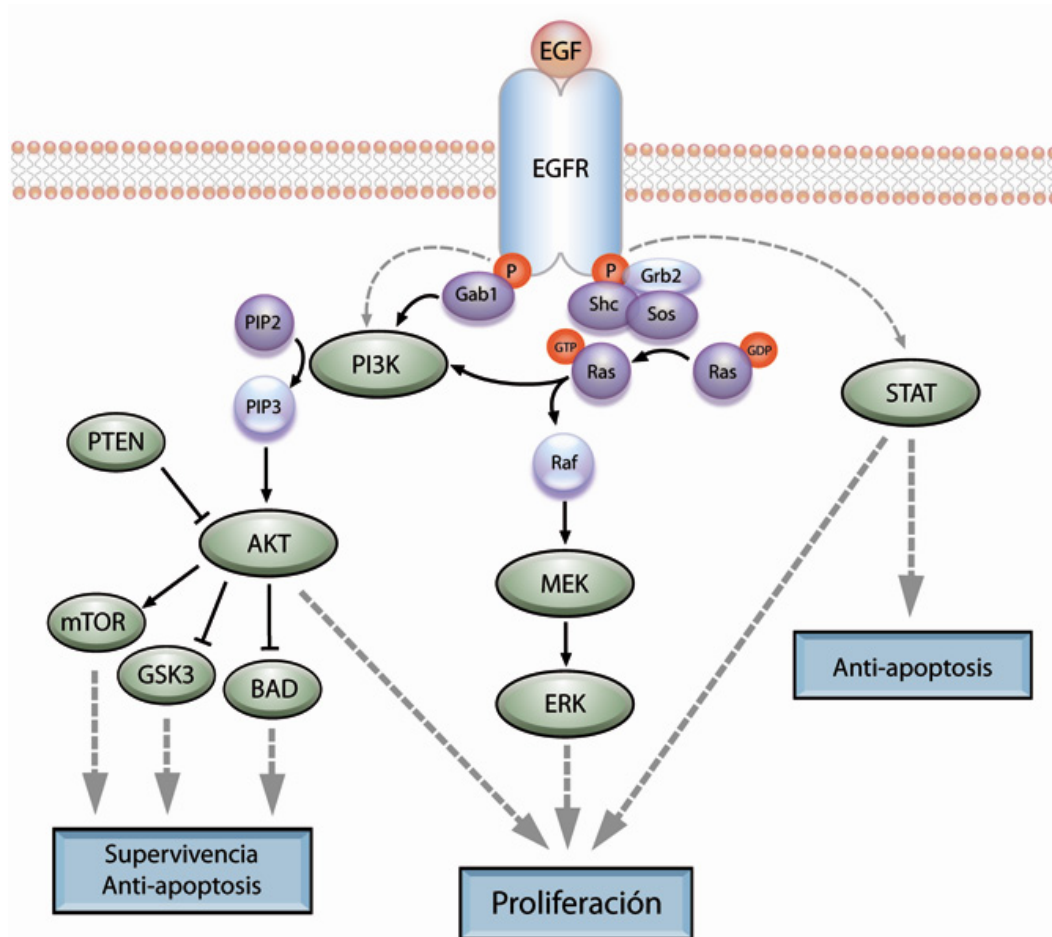


Figura 4. Vías de señalización activadas por el factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

La unión del ligando al receptor de EGF provoca la dimerización y auto-fosforilación del mismo desencadenándose la activación de diferentes proteínas adaptadoras que activan distintas vías de señalización, como son la vía de la PI3K/AKT, la vía de las MAPKs y la vía de STAT. La activación del receptor de EGFR promueve la proliferación celular al incidir sobre proteínas reguladoras del ciclo, sobre proteínas promotoras de supervivencia y sobre proteínas anti-apoptóticas.

través de Y1068) o indirecta, a través de la unión de la proteína adaptadora Shc (Y1173, Y1148; Fig. 4) (Schulze y cols., 2005). Grb2 se une a la proteína Sos, que intercambia nucleótidos de guanina con Ras, la cual se activa al intercambiar su GDP por GTP (Fig. 4). Ras-GTP promueve división celular a través de varias vías de señalización como las de PI3K y JNK, aunque su vía clásica de señalización es la de las MAPK (Fig. 4). La primera quinasa de la cascada, Raf, se activa por la unión de Ras. Raf fosforila y activa la siguiente quinasa, MEK, que activa las quinasas ERK1 y ERK2 (Fig. 4) que se translocan al núcleo y fosforilan factores de transcripción, cambiando la expresión de genes tempranos como son c-myc, c-jun, c-fos, Elk-1 y c-Ets-2. La expresión de estos genes promueve el crecimiento, la diferenciación o la mitosis (Chuang y Ng, 1994; Treisman, 1996).

Uno de los genes tempranos más importantes codifica para el factor de transcripción Fos. El aumento en la producción de Fos promueve la activación de otro factor de transcripción, AP-1, que dispara la expresión de una segunda ola de genes, llamados genes de respuesta tardía, que codifican para proteínas como la ciclina D1, que estimula la entrada en el ciclo celular (Lavoie y cols., 1996; Weber y cols., 1997). Otra proteína codificada por los genes de expresión temprana es Myc, cuyos niveles aumentan en la célula tras la estimulación con mitógenos y se mantienen altos durante todo el ciclo celular. Myc interactúa con otras proteínas relacionadas formando un complejo regulador que aumenta la expresión de un gran número de genes que codifican para proteínas reguladoras del ciclo celular, como son la ciclina D2 y CDK4, asegurándose la progresión del ciclo celular (Kapoor y O'Rourke, 2003).

De este modo, la activación de las proteínas ERK1 y ERK2 por parte de mitógenos extracelulares, ejerce un control directo sobre el ciclo celular (Fig. 3, Fig. 4), induciendo la expresión de la ciclina D1 (Sherr, 1994), siendo el estímulo que traslada a la célula desde G₀ a G₁. De forma contraria a la ciclina D1, el inhibidor p27, que se encuentra expresado en células quiescentes (Coats y cols., 1996), disminuye al estimular con factores de crecimiento (Rivard y cols., 1996). Las MAPK fosforilan *in vitro* a p27 (Kawada y cols., 1997), provocando su degradación por la vía de la ubiquitinación (Fig. 3).

La vía de la PI3K/Akt y el control del ciclo celular

La vía de señalización de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K; Fig. 4) se activa por la unión de la proteína acopladora Grb1 al receptor de EGF dimerizado y fosforilado (Li y cols., 1994). PI3K cataliza la conversión de PIP2 (fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato) a PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato), el cual se une y activa a la proteína Akt. Mediante la fosforilación de diferentes sustratos (Fig. 4), Akt regula procesos como la supervivencia, el ciclo celular o la apoptosis.

En lo que respecta al ciclo celular, Akt regula los niveles de ciclina D y de los factores de transcripción Myc y AP-1 implicados en la progresión del ciclo celular. La proteína GSK3 β , mediante fosforilación, inhibe Myc y AP-1 y provoca la degradación de la ciclina D1, impidiendo la división. Akt fosforila e inactiva a GSK3 β (Fig. 4), regulando de este modo la

progresión del ciclo y facilitando la transición de G₁ a S (Diehl y cols., 1998;Gregory y cols., 2003). Además, Akt regula la transición de G₁ a S a través de los inhibidores del ciclo p21 y p27 a nivel tanto transcripcional como postranslacional. Por una parte, Akt fosforila a p27 provocando su salida al citoplasma y su posterior degradación, permitiendo la progresión del ciclo celular (Shin y cols., 2002). Por otra parte, Akt fosforila FKHRL-1 inhibiendo su actividad transcripcional lo que lleva a una disminución de p27 a nivel de ARNm (Medema y cols., 2000). También se ha descrito que Akt inhibe a p21 de igual manera que a p27 (Maddika y cols., 2007). Por tanto, la vía de PI3K/Akt promueve la progresión del ciclo celular (Fig. 4) ayudando a aumentar los niveles de ciclina D y disminuyendo los niveles de inhibidores p21 y p27, lo que implica fosforilación de Rb y la promoción de la progresión del ciclo celular.

En lo que respecta a la apoptosis, Akt fosforila proteínas como BAD (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl2) (Datta y cols., 1997), caspasa 9 (Cardone y cols., 1998) y Mdm2 (provoca la degradación de p53) (Mayo y Donner, 2001) impidiendo los procesos apoptóticos provocados por ellos y aumentando la supervivencia de las células tumorales (Fig. 4).

La vía de STAT

Las proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STAT) pueden ser activadas por el receptor de EGF. EGFR (Fig. 4), a través de las proteínas JAK, fosforila las proteínas STAT-1, -3 y -5, que forman complejos entre ellas y se translocan al núcleo donde se unen a secuencias específicas de ADN, activando la transcripción de múltiples genes incluyendo p21, ciclina D1, myc, Bcl-2 y caspasa 1 (Lui y Grandis, 2002). Esta vía de señalización del receptor de EGFR parece no estar implicada en la progresión tumoral en los gliomas. (Huang y cols., 2009).

1.3.3. Función del receptor del factor de crecimiento epidérmico en gliomas.

Las células tumorales adquieren alteraciones génicas que reducen su dependencia de estimulantes exógenos del crecimiento, produciéndose una división celular constitutiva e inapropiada. Los gliomas evaden el control del ciclo celular por varios mecanismos, como por ejemplo la activación constitutiva de los receptores tirosina quinasa (Furnari y cols., 2007). Diversos factores de crecimiento tienen receptores tirosina quinasa, como EGF, PDGF y FGF, pero el receptor que con mayor frecuencia aparece mutado en los glioblastomas es EGFR, postulándose como la clave para el desarrollo y progresión de esos tumores.

Existen múltiples mecanismos a través de los cuales EGFR media el inicio y la progresión de los glioblastomas, como son la sobre-expresión del receptor o el incremento de la cantidad de ligando, formándose un bucle de activación autocrino, o mediante mutaciones activadoras del receptor. Uno de esos mecanismos es el aumento de la abundancia de EGFR, común en glioblastomas primarios. La amplificación de EGFR ocurre en el 60% de los

glioblastomas primarios (Fig. 1), aunque no se observa en astrocitomas de grado bajo (Ekstrand y cols., 1992; Ohgaki y cols., 2004). Todos los glioblastomas con amplificación génica de EGFR tienen consecuentemente sobre-expresión de EGFR, pero no a la inversa. La sobre-expresión de EGFR también aparece en el 10% de los glioblastomas secundarios (Fig. 1) (Watanabe y cols., 1996). Esta sobre-expresión de EGFR en los glioblastomas se acompaña ocasionalmente de un aumento en la cantidad de sus ligandos (EGF, TGF α y HB-EGF), que activan permanentemente esta vía mitogénica formando un bucle autocrino de activación (Singh y Harris, 2005).

Los fenómenos de amplificación génica y splicing alternativo llevan a la coexpresión de receptores de EGF normales y mutados. Las mutaciones en EGFR abarcan desde mutaciones puntuales y deleciones en el dominio extracelular a deleciones en el dominio citoplasmático del receptor (Frederick y cols., 2000; Zandi y cols., 2007). En glioblastomas se han hallado cinco mutaciones, tres de ellas afectando al dominio extracelular (EGFRvI, II y III), haciendo que el receptor este constitutivamente activo, y dos afectando a la cola citoplasmática (EGFRvIV y V), presentando defectos en la internalización del receptor y por tanto en la regulación de su degradación (Huang y cols., 2009). La mutación más frecuente encontrada en glioblastomas es la forma oncogénica EGFRvIII. Aproximadamente el 60% de los glioblastomas que muestran sobre-expresión de EGFR expresan también esta mutación (Sugawa y cols., 1990), y los estudios clínicos muestran una correlación entre la presencia de esta mutación y una peor prognosis en los pacientes (Feldkamp y cols., 1999). EGFRvIII posee deleciones en el dominio extracelular, mostrando constitutivamente actividad quinasa y, por tanto, presentando una activación constitutiva, independiente de la unión al ligando (el resto de EGFR mutados mantienen la capacidad de unión al ligando), por lo que la proliferación celular se encuentra aumentada.

El resultado final de todas las estrategias que adoptan los gliomas con respecto al receptor de EGF es la activación constitutiva del receptor y la activación de las vías de señalización que desencadenan la activación de la división celular, evadiendo los mecanismos reguladores. A estas alteraciones se le suman los cambios que se producen en los componentes de las vías de señalización activadas por este receptor, principalmente en la vía de las MAPK y de PI3K (Fig. 4).

Alteraciones en las vías de señalización activadas por EGFR en gliomas

Una de las consecuencias de la activación constitutiva de EGFR es que las dos proteínas adaptadoras Grb2 y Shc, que intervienen en la activación de Ras (Fig. 4), se encuentran constitutivamente unidas al receptor, por lo que la vía de las quinasas ERK1 y ERK2 se encuentra constantemente activa, promoviendo la progresión del ciclo celular (Montgomery y cols., 1995). En astrocitomas se han encontrado niveles elevados de la proteína Ras activada aunque no se presentan mutaciones ni formas constitutivamente activas (Guha y cols., 1997). Por el contrario, sí que aparecen deleciones de una región del cromosoma 10 que codifica para un supresor de Ras, RSU-1, en un 30% de los gliomas (Chunduru y cols., 2002), junto con

mutaciones en NF1, que regula negativamente la activación de Ras (Cichowski y cols., 1996), lo que puede provocar expresión elevada de Ras en los gliomas. El aumento de la activación de Ras se traduce en elevados niveles de ciclina D1 y, por tanto en una aceleración de la progresión desde G₁, además de un aumento en los niveles de los complejos ciclina D/CDK4 en los gliomas, que dirigen a las células a la fase de síntesis y mitosis (Liu y cols., 1995).

Otra de las proteínas mutadas en tumores es PTEN, fosfatasa encargada de retirar el fosfato de la PI3K, deteniendo la vía de señalización PI3K/Akt (Fig. 4). Esta proteína es, por tanto, un importante supresor tumoral, que esta inactivado en el 50% de los gliomas de grado alto, resultando en la señalización incontrolada de la vía de la PI3K (Ohgaki y cols., 2004). La mutación de PTEN en las células de glioblastoma, junto con la activación de EGFR, provocan el aumento de la expresión de VEGF de una forma dependiente de PI3K/Akt, por lo que esta vía también es fundamental en la angiogénesis, proceso necesario para el desarrollo de los glioblastomas (Pore y cols., 2003). Alrededor del 80% de los glioblastomas humanos expresan Akt constitutivamente, lo que provoca un aumento en la supervivencia de las células tumorales, empeorando la prognosis de los pacientes. La sobre-expresión constitutiva de Akt determina el paso de astrocitoma a glioblastoma multiforme.

Todo esto lleva a concluir que la gliomagénesis ocurre a través de una complicada cooperación entre las alteraciones génicas que se relacionan con las vías de señalización activadas por receptores tirosina quinasa, principalmente de EGFR y las alteraciones en la regulación del ciclo celular.

1.4. Muerte celular por apoptosis en los gliomas

Las células en un organismo forman una comunidad organizada, donde el número de células esta estrictamente regulado. Si una célula ya no es requerida, muere de forma controlada o programada. La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que se caracteriza por alteraciones en la membrana plasmática, pérdida de la asimetría de la membrana y, más tarde, pérdida de la integridad de la membrana, atrofia celular y aparición de cuerpos apoptóticos. Los restos de la célula son fagocitados sin lisis celular, por lo que no hay inflamación, participando en el proceso una serie de enzimas celulares que provocan la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, fragmentación del ADN y la degradación selectiva de proteínas mediante proteasas específicas o caspasas (Kroemer y cols., 1998).

La progresión tumoral requiere, además de la desregulación del ciclo celular, la resistencia frente a la apoptosis (Wechsler-Reya y Scott, 2001), asegurándose así la supervivencia de las células tumorales. La resistencia de los gliomas frente a la apoptosis es directamente proporcional al grado y número de alteraciones génicas sufridas y al grado de malignidad. La alteración más frecuente en los gliomas, relacionada con la inhibición de la apoptosis, es la inactivación de la proteína p53 (Lipinski y Jacks, 1999). Aproximadamente el 5% de los glioblastomas presenta resistencia a la apoptosis inducida a través de la vía de p53 debido a mutaciones del gen TP53, que inactivan la proteína (Bogler y cols., 1995). También

se generan amplificaciones del gen que codifica para la proteína Mdm2, encargada de secuestrar y degradar a p53, o mutaciones o deleciones del gen de INK4A/ARF, impidiendo la inhibición de la degradación de la proteína p53 mediada por Mdm2.

La apoptosis está regulada por proteínas de la familia Bcl-2, compuesta por miembros pro- y anti-apoptóticos. La sub-familia Bcl-2 o anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-XL, etc.) se encarga de preservar la integridad de la membrana mitocondrial, impidiendo la liberación del citocromo c, regulando de este modo la activación de la cascada de caspasas que median la apoptosis (Green y Kroemer, 2004). Las sub-familias BAX (BAX, BAK, BOK) y BH3 (BAD, BID, etc.) están compuestas de proteínas pro-apoptóticas, mediando fenómenos opuestos a la sub-familia Bcl-2. La expresión de proteínas pro-apoptóticas como BAX está activada por p53 (Miyashita y Reed, 1995). De manera complementaria, Akt fosforila proteínas como BAD (Datta y cols., 1997), caspasa 9 (Cardone y cols., 1998) y Mdm2 (Mayo y Donner, 2001) impidiendo los procesos apoptóticos provocados por ellos. De este modo, la apoptosis inducida por privación de factores tróficos esta inhibida en los gliomas debido a la sobre-expresión de factores de crecimiento y de sus correspondientes receptores.

1.5. Regulación de la función inmune en gliomas

El sistema nervioso se ha considerado tradicionalmente un ambiente inmunológicamente restringido, debido a la existencia de la barrera hematoencefálica y a la limitada presencia de células inmunes. Sin embargo, este concepto de “inmunoprivilegio” del SNC está siendo reconsiderado, ya que muchos estudios han evidenciado respuestas inmunes potentes en varias enfermedades del SNC, así como alteraciones del sistema inmune en otras patologías, como los gliomas malignos. Diversos estudios muestran el rechazo de xenotransplantes y alotransplantes intracraneales en animales inmunocompetentes, lo cual no ocurre en animales inmunodeprimidos (Kanu y cols., 2009). En estas condiciones, la barrera hematoencefálica es permeable a la comunicación con el sistema inmune, abriéndose una vía de entrada de linfocitos al SNC. En el interior del SNC, son las células microgliales las encargadas de adoptar el papel de célula presentadora de antígeno para los linfocitos, pudiendo de este modo elaborar respuestas inmunes complejas frente a los tumores (Gehrmann y cols., 1995).

Los gliomas generan un estado inmunológico alterado, que generalmente afecta a la capacidad del sistema inmune para identificar a los tumores como dianas. Las células tumorales expresan numerosos antígenos relacionados con los tumores (Chi y cols., 1997), pero los gliomas desarrollan diferentes mecanismos con los que consiguen evadir la vigilancia del sistema inmune. Las células de glioma y las del sistema inmune interaccionan de forma compleja a través de citoquinas inmunosupresoras producidas por el glioma como son TGF β 2, VEGF, IL-10, IL-6, IL-8 y prostaglandinas (Zou y cols., 1999). Esta respuesta tumoral provoca la inhibición de la proliferación de linfocitos T y B, y la inhibición de la activación de células NK (Natural Killer) y de células presentadoras de antígeno. De este modo, los gliomas generan un estado de inmunosupresión, tanto local como sistémica, que impide una

respuesta inmune eficaz frente al crecimiento tumoral. En base a estas ideas, la potenciación de la función inmune puede resultar efectiva como tratamiento antitumoral en gliomas.

1.6. Terapias y tratamientos actuales de los gliomas

A pesar del conocimiento existente sobre la biología molecular de los gliomas, la mayoría de las terapias, que ofrecían resultados prometedores en ensayos pre-clínicos, no son eficaces en las fases clínicas, debido en parte a la resistencia que presentan estos tumores a los tratamientos clásicos de radioterapia y quimioterapia. La naturaleza heterogénea de los gliomas malignos, debido a la multitud de alteraciones genéticas, hace muy complicada su aproximación terapéutica. Existe un amplio número de estrategias quimioterapéuticas, que abarcan múltiples tratamientos y aproximaciones. Los tipos más comunes de quimioterapias bajo investigación incluyen la terapia con inhibidores de dianas moleculares, terapias anti-angiogénicas, inmunoterapias, terapia génica y drogas para evitar la resistencia de los tumores.

El tratamiento estándar de los gliomas usado en la actualidad se basa en un protocolo desarrollado por Stupp (Stupp y cols., 2002; Stupp y cols., 2005). Después de la resección quirúrgica del tumor, el tratamiento consiste en combinar temozolamida (TMZ) con radioterapia y la administración posterior de TMZ durante 6 semanas como adyuvante. La temozolamida es un agente alquilante, cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la replicación del ADN. Es un pro-fármaco que se transforma espontáneamente en el organismo en monometil triazenoimidazol carboxamida (MTIC), su metabolito activo, que provoca la metilación de algunas bases del ADN. La temozolamida atraviesa la barrera hematoencefálica y es capaz de superar la resistencia intrínseca de las células tumorales frente los fármacos que dañan el ADN. Actualmente en España se están llevando a cabo tres ensayos clínicos en pacientes con gliomas. El primero se encuentra en fase III y combina TMZ con radioterapia. El segundo, en fase III, combina radioterapia con TMZ y con Avestin (Bevacuzumab), un anticuerpo monoclonal contra VEGF que inhibe la angiogénesis. El tercer ensayo clínico en marcha se encuentra en fase II y esta dirigido a niños con glioma o meduloblastoma, y combina TMZ con irinotecan, un antitumoral que inhibe la topoisomerasa I parando el ciclo celular en fase G_2 y que es el tratamiento de elección en cáncer colorectal (Sociedad Española de Oncología Médica, 2009).

A pesar de todas las ventajas que ha aportado al tratamiento de los gliomas, la temozolamida es un tratamiento paliativo que solo consigue alargar la vida de los pacientes unos meses. Por ello existe un gran interés en el estudio de diferentes aproximaciones terapéuticas para mejorar la prognosis de los gliomas. Respecto a las terapias anti-angiogénicas, se ha desarrollado el uso de anticuerpos contra factores como la integrina $\alpha v \beta 5$ (cilengitida), el factor de crecimiento de los hepatocitos (AMG-102), VEGF (bevacizumab) y el receptor de VEGF (sunitinib; (Kanu y cols., 2009). La inmunoterapia incluye el uso de vacunas de células dendríticas (DCVax), vacunas de péptidos específicos de tumores (péptidos de EGFRvIII), y anticuerpos monoclonales (Kanu y cols., 2009). También se

han desarrollado terapias dirigidas hacia una sola molécula, como inhibidores que tienen dianas como la farnesil transferasa (lonafarnib), histona deacetilasa (vorinostat), proteínas de choque térmico (AT13387) o el proteosoma (bortezomib), entre otras. En este sentido, muchos estudios se centran en la combinación de diferentes estrategias, como medio efectivo de inhibición tumoral.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico como diana terapéutica en gliomas

En la actualidad se están desarrollando múltiples aproximaciones terapéuticas basadas en la modulación de los receptores tirosina quinasa y las vías de señalización activadas por estos. Las más prometedoras se centran en el receptor de EGFR, ya que la sobre-expresión y mutación de este receptor contribuye a la progresión de los glioblastomas y, en muchos casos, a la generación de quimioresistencia.

El bloqueo de los receptores tirosina quinasa aberrantes se alcanza mediante el uso de pequeñas moléculas inhibitoras. Estos inhibidores interfieren selectivamente con la actividad tirosina quinasa intrínseca, inhibiéndose la auto-fosforilación del receptor y por tanto las cascadas de señalización activadas. Principalmente, existen tres inhibidores de la actividad tirosina quinasa de EGFR: gefitinif, erlotinif y lapatinif (Nyati y cols., 2006), cuyo uso ya está aprobado en cánceres de pulmón y mama. Múltiples estudios en modelos de xenotransplantes de tumores con expresión de EGFRvIII muestran que estos tumores son resistentes a la monoterapia con erlotinif y gefitinif (Learn y cols., 2004). Esto se ha correlacionado con el hecho de que estos pacientes, además de EGFRvIII, mostraban pérdida de PTEN, por lo que los tumores eran resistentes a la inhibición del receptor. En este tipo de tumores se ha demostrado la efectividad de la combinación de erlotinif con inhibidores de la vía de las PI3K/AKT (Fan y cols., 2006; van den Bent y cols., 2009). En este sentido, se han desarrollado múltiples inhibidores de moléculas clave en la vía de señalización de los receptores tirosina quinasa como Akt (perifosina), mTOR (sirolimus), PI3K (BEZ235), PKC- β , (enzastaurin y tamoxifen), Ras (tipifarnib) Raf (sorafenif), Src (dasatinib), y sobre factores de crecimiento que activan estos receptores como PDGF (imatinib) y TGF β (AP12009; (Furnari y cols., 2007).

Alrededor del 50% de los glioblastomas coexpresan altos niveles de EGFR y del receptor mutado EGFRvIII. La generación de anticuerpos monoclonales contra a ambos bloquea la progresión tumoral mediada por dichos receptores. El anticuerpo más efectivo contra EGFRvIII es Mab Y10, que reconoce tanto la forma humana como la murina (Sampson y cols., 2000). Este tratamiento es altamente eficaz, disminuyendo el crecimiento de tumores subcutáneos en ratones desnudos mediante administración sistémica, aunque no resulta efecto sobre tumores intracraneales. Otro anticuerpo frente a EGFRvIII es Mab 806, que previene la fosforilación del receptor y por tanto reduce la activación de las cascadas de señalización que éste regula. Su administración sistémica reduce el crecimiento de xenotransplantes intracraneales en ratones desnudos y aumenta la supervivencia de los mismos (Mishima y cols., 2001), aunque se ha observado un re-crecimiento del tumor a las

tres semanas del tratamiento. Para potenciar la inhibición, Mab 806 se coadministra junto con pequeñas moléculas inhibidoras de EGFR como AG1478 u otros anticuerpos frente a EGFR como Mab 528, siendo efectivo en ratones desnudos con gliomas subcutáneos (Johns y cols., 2003). Un estudio reciente en fase I con Mab 506 mostró su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica en pacientes con astrocitoma anaplásico o de grado III (Scott y cols., 2007). Esta capacidad de los anticuerpos monoclonales de reconocer específicamente a EGFRvIII es muy prometedora, ya que permite la conjugación con radioisótopos o con toxinas y pudiendo así ensayar nuevas estrategias de tratamiento. También se han desarrollado estudios pre-clínicos satisfactorios en glioblastomas tratando con C225 o cetuximab, un anticuerpo específico contra EGFR, cuyo uso ya está aprobado para el tratamiento de tumores de cabeza y cuello (Emanuel y cols., 2008; Martens y cols., 2008).

Todas estas estrategias que tienen como diana el receptor de EGF provocan una reducción importante del tumor en ensayos pre-clínicos, siendo muy esperanzadoras para el tratamiento de glioblastomas en un futuro (Huang y cols., 2009). En la actualidad se están realizando estudios clínicos, en diferentes fases, con terapias combinadas para el tratamiento de gliomas. La lista de ensayos clínicos se puede consultar en las siguientes páginas web: [://www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) y [://www.controlled-trials.com](http://www.controlled-trials.com).

2. LOS GANGLIÓSIDOS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: PAPEL EN LA PATOLOGÍA TUMORAL

2.1. Estructura y clasificación de los gangliósidos

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico en su estructura (Klenk, 1942) y se localizan en la membrana plasmática de las células de todos los vertebrados. Son moléculas anfipáticas, con una parte hidrofóbica, la ceramida, con la que se insertan en la membrana, y una hidrofílica, una cadena de monosacáridos de tamaño variable, que se orienta hacia el espacio extracelular (Fig. 5). Los gangliósidos son los glicoesfingolípidos más importantes del SNC, debido a su abundancia, y se caracterizan por poseer una N-acetilgalactosamina unida por un enlace $\beta(1-4)$ a la galactosa de la lactosilceramida ($\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1'\text{-ceramida}$). A partir de esta estructura básica, y atendiendo a las rutas de biosíntesis y a su estructura, los gangliósidos se dividen en las series **0** (Gg3, Gg4, GM1b, GD1c), **a** (GM3, GM2, GM1a, GD1a, GT1a), **b** (GD3, GD2, GD1b, GT1b, GQ1b), y **c** (GT3, GT2, GT1c, GQ1c, GP1c), en función de las cadenas de azúcares que forman la estructura, como se observa en el esquema (Fig. 5). La serie **0** se caracteriza por no tener ácidos siálicos unidos a la galactosa, la serie **a** posee un ácido siálico en la galactosa, mientras que la serie **b** posee dos ácidos siálicos seguidos; la serie **c** posee tres (Fig. 5).

Una de las familias de gangliósidos más importantes en el sistema nervioso es la serie **b** (Fig. 5), siendo GD1b uno de los gangliósidos más relevantes. La estructura de GD1b está formada por una cadena de azúcares constituida por una N-acetilgalactosamina unida a la lactosilceramida, seguida de una galactosa ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1'\text{-}$

ceramida) y dos ácidos siálicos consecutivos unidos a la galactosa de la lactosilceramida (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4 [Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida).

La síntesis de los gangliósidos se lleva a cabo en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi. En el retículo endoplasmático se sintetiza la ceramida, a partir de sus precursores L-serina y palmitoil-coenzima A (CoA), catalizada por la serin-

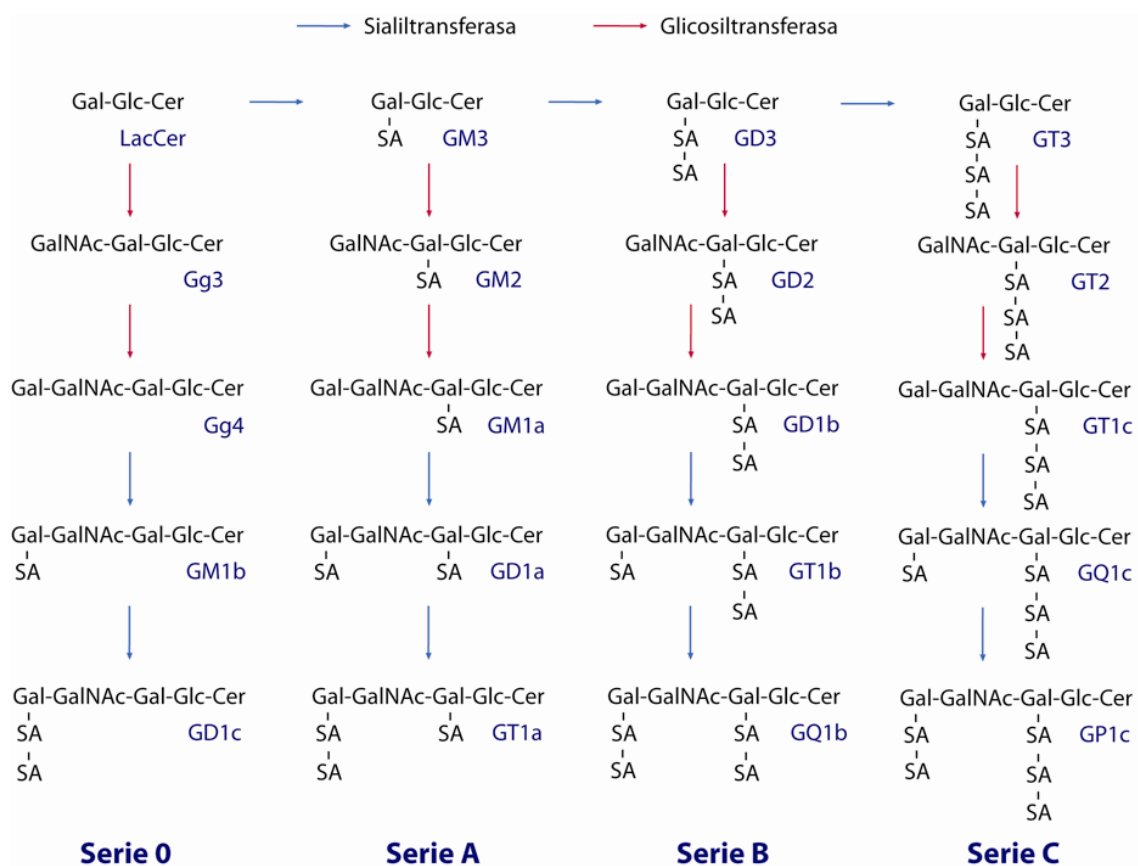


Figura 5. Estructura de los gangliósidos y rutas de biosíntesis.

Estructura simplificada y rutas de biosíntesis de los gangliósidos de las diferentes series **0**, **a**, **b**, **c**. Cer- ceramida; Glc- glucosa; Gal- Galactosa; GalNAc- N-Acetilgalactosamina; SA- Ácido siálico.

palmitoiltransferasa. En el aparato de Golgi se forma la cadena de azúcares (van y Sandhoff, 1993), por la acción de diferentes enzimas como son la galactosiltransferasa (Gal-T) que adiciona galactosas, la glucosiltransferasa (Glu-T) que adiciona glucosas, la N-acetilgalactosaminiltransferasa (GalNAc-T) que adiciona N-acetilgalactosaminas y las sialiltransferasas (ST) que adicionan ácidos siálicos o neuroamínicos. Los gangliósidos más sencillos, como GM3 y GD3 (Fig. 5), se sintetizan en el compartimento cis-Golgi, sin embargo los más complejos o con mayor número de monosacáridos, como GM1a, GD1a, GD1b, GT1b y GQ1b, se forman en el trans-Golgi.

La expresión de los enzimas de síntesis de los gangliósidos se encuentra regulada traduccional y postraduccionalmente. La síntesis de los gangliósidos es secuencial, lo que

implica que la actividad de una enzima regula la disponibilidad del sustrato sobre el que actúa el enzima siguiente. (Ruan y Lloyd, 1992; Yamashiro y cols., 1993).

La O-acetilación es la modificación más común de los grupos hidroxilo de los ácidos siálicos (Varki, 1992) de los gangliósidos. Los O-acetil ésteres del ácido siálico son específicos de tejido y su expresión está regulada durante el desarrollo. La acetil coenzima A actúa como donador de acetilos para las posiciones 7 y 9 del ácido siálico. La presencia de un pH ácido en el aparato de Golgi favorece que el 7-O-acetilo sea más estable (Kamerling y cols., 1987). Los gangliósidos recién sintetizados, al dirigirse a la membrana, se encuentran con un pH más alcalino, que favorece la migración del O-acetilo desde el C7 al C9 (Kamerling y cols., 1987).

El transporte de los gangliósidos, durante su síntesis o su degradación, se realiza en vesículas, aportando al sistema una elevada tasa de recambio. El catabolismo de los gangliósidos se produce a través de reacciones de hidrólisis secuenciales, mediadas por un conjunto de hidrolasas: neuroaminidasas, β -galactosidasas, β -hexosaminidasas, glucosilceramida β -glucosidasas y ceramidasa (Kopitz y cols., 1997). Los productos de degradación de los gangliósidos son reutilizados en su síntesis o en la de otros compuestos. Los grupos O-acetilo de los ácidos siálicos se hidrolizan mediante las O-acetil esterasas, específicas para ésteres en la posición 9, siendo incapaces de hidrolizar los grupos en posición 7, lo que apoya la idea de la migración del grupo acetilo del C7 al C9 (Higa y cols., 1989).

2.2. Los gangliósidos en el sistema nervioso central

Los gangliósidos son moléculas muy abundantes en el SNC, variando su patrón de expresión y concentración en función de la región y edad del individuo. Así, en fases tempranas del desarrollo (E14 en rata; sexta semana en humano) (Yu y cols., 1988; Svennerholm y cols., 1991) existe una elevada expresión de gangliósidos sencillos (GM3 y GD3) en células precursoras de la zona subventricular (Goldman y Reynolds, 1996; Stojiljkovic y cols., 1996). Posteriormente aumentan los gangliósidos de la serie b, como GD1b, GT1b y GQ1b (Yu y cols., 1988), relacionándose con la migración celular o la sinaptogénesis. Tras el día E18 en rata, o la duodécima semana en humanos, aumentan los gangliósidos de la serie a, como GM1b, GD1a o GT1a, relacionados con las interacciones neurona-glía y la síntesis de mielina (Stojiljkovic y cols., 1996), mientras que GM3 o GD3 se reducen (Yu y cols., 1988). En el adulto, los gangliósidos más abundantes son GM1a, GD1a, GD1b y GT1b.

Las neuronas y las células gliales presentan una composición de gangliósidos variada. Los astrocitos de rata expresan mayoritariamente los gangliósidos GM3 y GD3 (Murakami y cols., 1999) (Sbaschnig-Agler y cols., 1988). Los oligodendrocitos contienen preferentemente GM1a, GM4 y GD3. En cambio, las neuronas presentan una mayor cantidad y variedad de gangliósidos, siendo mayoritarios los gangliósidos complejos (Byrne y cols., 1988) (Kawashima y cols., 1996). Las neuronas expresan gangliósidos de la serie a, como GM2 y GM1a (Byrne y cols., 1988). El gangliósido GD1a, por ejemplo, se encuentra en las

membranas sinápticas (Ando, 1984), interviniendo en la maduración de las interacciones neurona-glía *in-vitro*. Durante la diferenciación glial se produce un aumento de gangliósidos complejos y, dada la baja actividad de los enzimas que los forman, la mayor parte de estos gangliósidos parece proceder de las neuronas. En este sentido, las regiones del cerebro enriquecidas en neuronas contienen mayores concentraciones de gangliósidos que las regiones con densidad neuronal menor.

2.2.1. Funciones de los gangliósidos en el sistema nervioso central

Los gangliósidos participan en la regulación de diversas funciones. Durante la diferenciación del SNC, los gangliósidos muestran cambios cualitativos y cuantitativos, sugiriendo que estos glicolípidos tienen un papel importante durante la morfogénesis, el crecimiento, la migración y la diferenciación celular (Drazba y cols., 1991; Yamashita y cols., 1999).

La localización preferencial de los gangliósidos en la cara externa de la membrana plasmática posibilita su participación en procesos de comunicación intercelular en el SNC. Un pequeño porcentaje de los gangliósidos se encuentra en la membrana de los orgánulos o en forma soluble, permaneciendo la mayor parte (alrededor del 70%) insertados en la membrana celular o agrupados en micro-dominios. La localización en micro-dominios de membrana (rafts y caveolas) les permite entrar en contacto con receptores de factores de crecimiento, como EGFR, neurotransmisores, integrinas, o proteínas adaptadoras en la transducción de señales como Ras o PI3K (Anderson, 1998), modulando su función. Los gangliósidos, como moduladores de la proliferación celular, pueden influir sobre rutas de segundos mensajeros activadas por receptores de mitógenos, neurotrofinas y otras proteínas de matriz extracelular. Del mismo modo, la adición exógena de gangliósidos podría cambiar la estabilidad de las caveolas y modificar así las rutas de segundos mensajeros de los receptores de factores de crecimiento (Simons y Ikonen, 1997).

La implicación de los gangliósidos en la regulación de la proliferación celular fue evidenciada por los cambios en su síntesis asociados a la transformación oncogénica, a la inhibición por contacto y a los distintos estadios del ciclo celular. Los gangliósidos presentan la capacidad tanto de estimular la proliferación (Pettmann y cols., 1988) como de inhibirla (Icard-Liepkalns y cols., 1982). En relación con las funciones inhibitorias se han descrito interacciones de los gangliósidos con receptores de factores de crecimiento como EGFR (Song y cols., 1991), PDGFR (Van Brocklyn y cols., 1993), FGFR (Meuillet y cols., 1996) IGFR (Nojiri y cols., 1991) y otros receptores tirosina quinasa como los de las neurotrofinas (Farooqui y cols., 1997).

Los gangliósidos también pueden actuar interaccionando con moléculas extracelulares que median adhesión celular como la fibronectina, integrinas y selectinas (Yates y Rampersaud, 1998), uniéndose a su porción glucídica y relacionándose con la regulación de la adhesión celular, la proliferación y la apoptosis (Jessell y cols., 1990). La parte glucídica de los gangliósidos también interacciona con la glicoproteína asociada a mielina (MAG), que se

une preferentemente GD1a y GT1b, regulando el establecimiento de interacciones mielina-axón y el crecimiento axonal después de una lesión (McKerracher, 2002)).

Por tanto, los gangliósidos juegan un papel esencial en diversas funciones, incluyendo el reconocimiento célula-célula (Hakomori, 1990), la adhesión celular (Iwabuchi y cols., 1998), la transducción de señales (Amat y cols., 1996) *et al.*, 1996; (Miljan y cols., 2002), la proliferación (Hanai y cols., 1988), la diferenciación (Zervas y Walkley, 1999) o la invasividad tumoral (Hakomori, 1996).

Modulación de la respuesta a factores de crecimiento por gangliósidos

Existen múltiples estudios sobre la contribución de los gangliósidos de la superficie celular al control de la proliferación celular (Hakomori, 1996). Los gangliósidos son capaces de interaccionar con los factores de crecimiento, modulando su señalización y, finalmente, la biología de la célula. Existen diferentes mecanismos mediante los cuales los gangliósidos modulan la función de los receptores de factores de crecimiento. Por un lado, pueden unirse directamente al ligando, impidiendo su unión al receptor. Alternativamente, pueden modular la actividad del receptor impidiendo su dimerización e inhibiendo la fosforilación y, además, pueden modificar la localización subcelular de los receptores, influyendo sobre su actividad. Se ha observado que GM1 inhibe la actividad de FGFR mediante la unión a su ligando FGF (Rusnati y cols., 1999). Sin embargo, GM1 también inhibe la activación de PDGFR, impidiendo la dimerización del receptor y por tanto la auto-fosforilación del mismo (Van Brocklyn y cols., 1993). La dimerización de PDGFR es inhibida también por GM2, GD1a, GD1b, GD3 y GT1b (Van Brocklyn y cols., 1993). Existen evidencias de que gangliósidos complejos, como GT1b, GD1b, GM1a y GM2, interaccionan directamente con el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2 o FGFb) impidiendo la unión a su receptor (FGFR), e inhibiendo así la proliferación de células endoteliales (Rusnati y cols., 1999). En este sentido, la diferente efectividad para cada gangliósido parece estar determinada por las cargas de los carboxilos de los ácidos siálicos, la secuencia de monosacáridos y la conformación espacial que adquiere la molécula. Esta idea está apoyada en el hecho de que no todos los gangliósidos inhiben la actividad de todos los receptores de factores de crecimiento, existiendo incluso gangliósidos que potencian la actividad de EGFR como es el caso de GD1b (Liu y cols., 2004). Por lo tanto, parece que la interacción de los gangliósidos con los receptores tirosina-quinasa es específica.

El gangliósido más estudiado en cuanto a su relación con receptores de factores de crecimiento es GM3, que modula la función de receptores tirosina quinasa como FGFR y EGFR. GM3 interacciona con el dominio extracelular del receptor de EGF, impidiendo su dimerización y fosforilación (Haga y cols., 2008). Esta interacción afecta a las vías de señalización intracelular (MAPK y PI3K) que desencadena la unión del factor de crecimiento a su receptor, inhibiéndose la expresión de genes tempranos como c-fos y c-jun en respuesta a GM3 (Rebbaa y cols., 1996). Todo esto sugiere que la interacción de los gangliósidos con los receptores de factores de crecimiento es capaz de modular la proliferación celular.

La sobreexpresión de factores de crecimiento y de sus receptores juega un papel muy importante en la tumorigénesis, incluyendo la gliomagénesis. La modulación del efecto mitogénico de los factores de crecimiento por parte de los gangliósidos supone una estrategia terapéutica muy prometedora para el tratamiento de los tumores que sobreexpresan receptores de factores de crecimiento (ej. EGFR), como es el caso de los gliomas (Birkle y cols., 2003).

2.3. Expresión y función de los gangliósidos en los gliomas

El análisis de los gangliósidos puede aportar información sobre el desarrollo y evolución de los procesos patológicos del SNC, ya que su composición y concentración en los tejidos y en los fluidos corporales varía, pudiendo actuar como marcadores moleculares de ciertas patologías. En este sentido, se han encontrado cantidades abundantes de gangliósidos en medios de cultivo de células tumorales, en el suero de pacientes con tumores (Portoukalian y cols., 1993) y en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con gliomas (Ladisch y cols., 1997). La relación entre estos cambios en la expresión de gangliósidos y la formación de los tumores cerebrales radica en la pérdida del control sobre el crecimiento y la proliferación dependiente de anclaje.

La expresión de GD3 en el sistema nervioso adulto aumenta considerablemente en procesos patológicos caracterizados por proliferación celular, como ocurre después de una lesión en la que los astrocitos forman la cicatriz glial (Kim y cols., 1986). El gangliósido GD3 también se sobre-expresa en los tumores cerebrales (Berra y cols., 1985) (He y cols., 1989). Así, el porcentaje de GD3 en un cerebro humano normal es del 4-5% de los glicolípidos, mientras que en una biopsia de glioblastoma es del 20% (Traylor y Hogan, 1980). El aumento de GD3 y GM3 en los gliomas coincide con la disminución de los gangliósidos complejos (Berra y cols., 1985) (Wagener y cols., 1999). Los astrocitomas de grado I se caracterizan por una elevada expresión del gangliósido GD3, y una reducida concentración de gangliósidos de las series **a** y **b** (Fig. 5). El aumento del grado de los astrocitomas de II, a III y IV, se correlaciona con un aumento de GM3 y GD3, y una disminución importante de gangliósidos de la serie **a** y, sobre todo, de la serie **b** (Fig. 5; GD1b, GT1b GQ1b) (Wagener y cols., 1999). El cociente entre la expresión de gangliósidos sencillos y gangliósidos complejos de la serie **b** (GD1b, GT1b y GQ1b) está relacionado con el grado de malignidad de los gliomas y por tanto con la supervivencia de los pacientes (Sung y cols., 1995; Wagener y cols., 1999; Yates y cols., 1999). En este sentido, la disminución del gangliósido GD1b, observada a medida que aumenta el grado de los tumores, ha llevado a emplearlo como marcador diagnóstico y pronóstico en gliomas primarios (Comas y cols., 1999).

Las células tumorales sintetizan y liberan al microambiente gangliósidos que pueden intervenir en la angiogénesis (Alessandri y cols., 1987; Manfredi y cols., 1999), la inmunosupresión y la metástasis inducidas por el tumor (Birkle y cols., 2003). La adición exógena de GD3 al medio de cultivo de células de glioma estimula la expresión de VEGF (Koochekpour y Pilkington, 1996). Sin embargo, GM3 inhibe al inductor de angiogénesis

FGFb, siendo la proporción entre ambos gangliósidos determinante para el desarrollo de la angiogénesis. Gangliósidos, como GD3 y GM2, inhiben la actividad de varias células inmunes, como los linfocitos T o las células NK (Offner y cols., 1987), e inhiben la expresión de TNF- α o MHC-II, claves para la función inmune (Ziegler-Heitbrock y cols., 1992). La regulación de la función de las células T por gangliósidos ocurre preferentemente a través de la modulación de la actividad de IL-2 y su receptor, inhibiendo la respuesta tipo Th1 (Irani y cols., 1996). El gangliósido GD3, expresado en células tumorales, es un potente regulador de la acción de la IL-2 y la IL-15 (Hoon y cols., 1988; Gomez-Nicola y cols., 2006). Se ha demostrado que IL-2 se puede unir directamente a gangliósidos, presentando mayor afinidad por GD1b (Ravindranath y cols., 2001). Estas y otras evidencias apuntan a que el efecto inmunosupresor observado en pacientes con cáncer puede estar fundamentado en la acción de los gangliósidos (Floutsis y cols., 1989).

Los gangliósidos también regulan la adhesión y el reconocimiento intercelular, mediando en el desarrollo de metástasis. GD2 y GD3, por ejemplo, han sido descritos como reguladores del anclaje de células de neuroblastoma y melanoma a la matriz extracelular (Cheresh y cols., 1986). Esto ocurre a través de la unión a las integrinas $\alpha 5 \beta 1$ o $\alpha v \beta 3$, como se evidenció mediante inmunoprecipitación de los gangliósidos GT1b, GD3 y GD2 (Cheresh y cols., 1987; Wang y cols., 2001). Otros estudios han postulado que los gangliósidos son promotores de metástasis a través de interacciones entre glicoesfingolípidos. De este modo, se ha demostrado que GM3 se une a LacCer y a Gg3, regulando fenómenos de adhesión y activación de c-Src, RhoA y FAK y promoviendo invasividad celular (Yamamura y cols., 1997).

2.4. Los gangliósidos O-acetilados en el SNC y en los gliomas

El ácido siálico o neuramínico es un monosacárido de 9 átomos de carbono, siendo el más abundante en los gangliósidos el ácido 5-N-acetil-neuramínico (Neu5Ac). Este monosacárido puede sufrir modificaciones en sus grupos hidroxilos, como acetilaciones, metilaciones, sulfatilaciones y fosfatilaciones que elevan su diversidad. Una de las modificaciones más frecuentes es la O-acetilación, consistente en la O-acetil esterificación de los grupos hidroxilos del ácido siálico, mediante la formación de un intermediario con un ortoéster interno (Furuhata, 2004). En condiciones fisiológicas de pH neutro o ligeramente alcalino, las O-acetilaciones de los carbonos 7 y 8 del ácido siálico migran a la posición 9, por lo que la O-acetilación en posición 9 es la más abundante (Varki y Diaz, 1984) (Butor y cols., 1993). La O-acetilación es catalizada por el enzima O-acetiltransferasa y utiliza acetil-CoA como donador de grupos acetilos. Los gangliósidos son desacetilados mediante O-acetilesterasas (Varki, 1992). La actividad O-acetilesterasa lisosómica (AEL) que se expresa en hígado, ovario y cerebro, es la encargada de desacetilar específicamente las O-acetilaciones en posición 9.

Los gangliósidos O-acetilados presentan características físico-químicas y biológicas diferentes a los gangliósidos parentales (Varki, 1992). Su hidrofobicidad, la carga neta, la conformación y susceptibilidad enzimática, cambian significativamente con respecto al

compuesto no acetilado. Además, su reconocimiento por lectinas animales y anticuerpos monoclonales se ve alterado alterado (Cheresh y cols., 1984;Sjoberg y cols., 1994), son receptores de virus como el de la gripe tipo C o coronavirus (Rogers y cols., 1986), son antígenos de cápsulas bacterianas (Orskov y cols., 1979) y moduladores de la activación del complemento por la vía alternativa (Varki y Kornfeld, 1980) (Shi y cols., 1996).

Los gangliósidos O-acetilados descritos en el sistema nervioso son: O-Ac LD1 (Chou y cols., 1990), O-Ac GD1a (Gowda y cols., 1984), O-Ac GD3 (Cheresh y cols., 1984), O-Ac GD2 (Sjoberg y cols., 1992), O-Ac GD1b o neurostatina (Hitoshi y cols., 1996;Abad-Rodriguez y cols., 1998), O-Ac GT1b (Ghidoni y cols., 1980), O-Ac GQ1b (Sonnino y cols., 1982), O-Ac GT3 y O-Ac GT2 (Waki y cols., 1993). Estos gangliósidos modificados se expresan abundantemente durante las fases tempranas del desarrollo del SNC, durante la diferenciación de los neuroblastos y la formación de conexiones. Previamente a la formación de la sinapsis, se expresan gangliósidos O-acetilados en los conos de crecimiento, como O-Ac GD3, O-Ac GT1b y O-Ac GQ1b (Igarashi y cols., 1994). A medida que va cesando la proliferación glial, la expresión de los gangliósidos O-acetilados se va reduciendo. En la edad adulta, la expresión de gangliósidos O-acetilados es muy reducida, reactivándose en procesos de daño al SNC, cuando se necesita el control de la proliferación glial (Nieto-Sampedro y Broderick, 1989;Rio y cols., 1995).

El aumento en la expresión de algunos gangliósidos O-acetilados, sobre todo de O-Ac GD3, ha sido evidenciado durante o después de la transformación de ciertos tejidos a estados malignos. Gangliósidos O-acetilados, como O-Ac GD3 y O-Ac GD2, se expresan selectivamente en melanomas (Cheresh y cols., 1984;Sjoberg y cols., 1992) y neuroblastomas humanos (Ye y Cheung, 1992;Zeng y cols., 1999). Anticuerpos contra O-acetilgangliósidos, como Jones o D1.1, marcan estas células tumorales en cultivo e inhiben su proliferación. La reducción en la síntesis de los gangliósidos O-acetilados, como O-Ac GD3, causa una reducción en la proliferación y un aumento en la diferenciación de células de melanoma (Birkle y cols., 2000) y neuroblastoma (Zeng y cols., 1999). Células de neuroblastoma que no expresan GD3 y O-Ac GD3, transplantadas en ratones desnudos, presentan una baja proliferación celular y una reducida formación de tumores (Koochekpour y Pilkington, 1996). También han sido probados anticuerpos contra O-acetilgangliósidos como terapia contra melanomas y neuroblastomas (Yu y cols., 1988;Soiffer y cols., 1997;Zhang y cols., 1998). Sin embargo, la acetilación de los ácidos siálicos terminales es necesaria para el efecto inhibitorio que presentan algunos gangliósidos (Birkle y cols., 2003), como es el caso de la neurostatina (O-Ac GD1b)(Romero-Ramirez y Nieto-Sampedro, 2004).

2.5. La neurostatina

La neurostatina es un gangliósido caracterizado como GD1b 9-O-acetilado en su siálico terminal (Fig. 6)(Abad-Rodriguez y cols., 2000). Se encuentra presente en el cerebro de todos los mamíferos y sus niveles de expresión varían durante el desarrollo. En el cerebro adulto de rata, los niveles de neurostatina son muy bajos, siendo las neuronas las principales células

productoras, expresándola en la membrana o liberándola al medio extracelular. El periodo de menor expresión en el cerebro de rata es la primera semana post-natal, coincidiendo con el periodo de máxima proliferación glial en la corteza cerebral (Vallejo-Cremades, 2001).

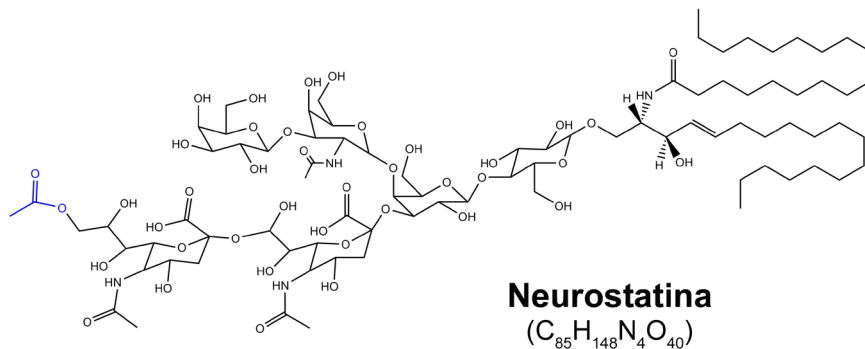


Figura 6. Estructura de la neurostatina.

La importancia de la neurostatina reside en su función de regulador natural de la proliferación de astrocitos, y en su actividad inhibidora de la división de líneas celulares de glioma humano (Abad-Rodriguez y cols., 1998; Abad-Rodriguez y cols., 2000; Romero-Ramirez y Nieto-Sampedro, 2004). Sin embargo, en cultivos celulares de fibroblastos de rata y diferentes líneas tumorales de fibroblastos, se necesitan concentraciones 10 veces superiores para producir un efecto, indicando cierta especificidad sobre células de linaje astrocitario (Abad-Rodriguez y cols., 1998; Abad-Rodriguez y cols., 2000).

El papel de los gangliósidos en la regulación del ciclo celular está fuertemente condicionado por la presencia de O-acetilaciones en sus siálicos terminales. Así, la concentración a la cual el precursor de la neurostatina, GD1b, presenta actividad inhibidora de la proliferación *in-vitro* de líneas de células tumorales, es de 50-400 μM (Ma y cols., 2004), mientras que la neurostatina lo hace a concentraciones mucho menores (400 nM-2 μM) (Vallejo-Cremades y Nieto-Sampedro, 2006). Para la línea de astrocitoma humano tipo III U373MG, la O-acetilación del ácido siálico terminal de GD1b es capaz de transformar una actividad mitogénica o ligeramente inhibidora de la proliferación en fuertemente inhibidora, siendo efectiva a concentraciones muy bajas (1,8 μM; (Romero-Ramirez y Nieto-Sampedro, 2004).

2.5.1. Estudios previos

En el cerebro de rata adulta, la inmunoreactividad contra el receptor de EGF es reducida, pero aumenta en zonas de proliferación y de activación de astrocitos, como las zonas próximas a una lesión. La actividad mitogénica para astrocitos de extractos de cerebro, tanto normal como lesionado, aumentó considerablemente tras ser tratados con un

anticuerpo contra EGFR (Nieto-Sampedro y cols., 1988; Gomez-Pinilla y cols., 1988). Se comprobó que el anticuerpo no mimetizaba la acción del EGF sino que retiraba ciertos componentes de los extractos que frenaban la proliferación y que compartían uno o más epítomos con EGFR (Nieto-Sampedro, 1988; Nieto-Sampedro y Broderick, 1989). Este inhibidor relacionado con EGFR (ERI) se describió como un inhibidor de la mitosis de astrocitos. La presencia de ERI se reduce en el cerebro lesionado a los treinta días, coincidiendo con la aparición de la gliosis post-lesión y sugiriendo la implicación de ERI en el control de la proliferación de astroblastos (Nieto-Sampedro y Broderick, 1989). El hecho de que el anticuerpo monoclonal anti-EGFR estuviera dirigido contra un epítipo glicídico hizo pensar que ERI era un gliococonjugado. Otras evidencias que relacionaban a ERI con cadenas glicídicas de los grupos sanguíneos llevaron a la investigación de los componentes oligosacáridicos de su estructura. El tetrasacárido sintético, análogo a ERI, TS4 (α -D-GalNAc(1→3) β -D-Gal(1→4)[α -L-Fuc(1→3)]D-Glc-Metilo), relacionado con los grupos sanguíneos A y Lewis X, resultó ser inhibidor de la mitosis de astrocitos a altas concentraciones (en el rango μ M)(Santos-Benito y cols., 1992). El estudio de Coterón (J.M.Coterón, 1995), demostró que la actividad de estos oligosacáridos no depende solamente de la secuencia de azúcares, siendo también la distribución de las cargas y su disposición espacial fundamentales para la actividad inhibitoria del compuesto.

El inhibidor ERI fue finalmente denominado neurostatina, en base a su presencia abundante en el tejido nervioso y a su actividad citostática dirigida a las células neurales (Abad-Rodriguez y cols., 1998). La neurostatina se caracterizó como un disialogangliósido de la serie **b**, con dos ácidos siálicos unidos entre sí a la galactosa de la lactosilceramida (GD1b) con una O-acetilación en su siálico terminal (Fig. 6) (Abad-Rodriguez y cols., 2000). Los espectros de resonancia magnética sugerían que esta O-acetilación se encontraba en el carboxilo 9 del ácido siálico terminal (Fig. 6). Esta hipótesis estaba apoyada por la literatura sobre los gangliósidos O-acetilados de la serie b, que postula la existencia de GD1b O-acetilado en posición 9 (Sjoberg y cols., 1992) y su purificación en extractos de cerebro bovino y nervio periférico humano mediante anticuerpos presentes en el suero de pacientes con el síndrome de Guillain-Barré (Hitoshi y cols., 1996). El estudio de las regiones moleculares relevantes para la inhibición de la proliferación mediada por neurostatina, mostró que la O-acetilación en posición 9 del ácido siálico terminal es fundamental para la actividad del compuesto y de otros gangliósidos O-acetilados, convirtiendo gangliósidos con actividad mitogénica en sustancias inhibitoras. Además, se observó que la cola galactosil-N-acetil galactosaminil también es importante para la actividad inhibitora del gangliósido, al interaccionar con los dos ácidos siálicos unidos consecutivamente, dejando expuesto el siálico O-acetilado terminal y la galactosa terminal por donde, probablemente, la neurostatina interaccione con sus efectores (Romero-Ramirez y Nieto-Sampedro, 2004).

Los estudios sobre la relación de la neurostatina con el receptor de EGF realizados previamente, sugieren un posible mecanismo de acción del gangliósido relacionado con la regulación de la función de receptores de mitógenos en la membrana, modulando la actividad enzimática asociada. A partir de este punto se verían afectadas las cascadas de

quinasas que estimulan los sistemas de ciclinas y, por ende, la regulación de la proliferación celular. Esto supondría una estrategia muy específica para la inhibición de la proliferación de los tumores que se desarrollan en el sistema nervioso.

2.5.2. Métodos de obtención de la neurostatina y sus gangliósidos derivados

La actividad anti-proliferativa diferencial de la neurostatina y el gangliósido GD1b, sugiere que la O-acetilación induce un cambio en la molécula que determina variaciones en la señalización celular, traduciéndose en cambios en la regulación del ciclo celular y, por tanto, en la capacidad mitótica de la célula.

A pesar de que la neurostatina se encuentra de forma natural en el SNC de todos los mamíferos, está presente en cantidades muy reducidas, como todos los gangliósidos modificados (Vallejo-Cremades y Nieto-Sampedro, 2006). Originalmente, la neurostatina se obtuvo a partir de extractos de cerebro bovino, dificultando este método su obtención y purificación en cantidades suficientes para permitir estudiar sus efectos, tanto en el sistema nervioso como en líneas tumorales cerebrales y en modelos experimentales tumorales *in vivo*. Durante el estudio del gangliósido GD3 se han utilizado varios mecanismos de O-acetilación regioselectiva en la posición 9 del ácido siálico del gangliósido, como son la síntesis enzimática con subtilisina y la síntesis química. La subtilisina es una serinproteasa, pero se ha descrito su actividad acetiltransferasa sobre el gangliósido GD3, empleando acetato de vinilo como donador de acetilos (Takayama y cols., 1996). La O-acetilación química fue puesta a punto para 9-O acetilar regioselectivamente ácidos siálicos y fue modificada para gangliósidos por Hubl (Hubl y cols., 2000). Este método de síntesis química permite la obtención de gangliósidos 9-O-acetilados, como 9-O-Ac GD3, en un tiempo corto y a temperatura ambiente, a diferencia de la síntesis enzimática con subtilisina, cuyas condiciones de reacción (cinco días de reacción a 37°C) favorecen la degradación de los productos de reacción.

Con la finalidad de estudiar en profundidad el papel de la neurostatina sobre la proliferación celular, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*, en el presente estudio proponemos la síntesis química de neurostatina, a partir de la O-acetilación regioselectiva del gangliósido GD1b, como medio de obtención de cantidades abundantes y preparaciones estandar de esta molécula. Esta idea implica la puesta a punto del método de síntesis química para la obtención de derivados O-acetilados de GD1b, como la neurostatina, que entraña la dificultad de obtener productos de reacción mono-sustituídos.

Otro de los inconvenientes que plantean los gangliósidos O-acetilados en cuanto a su producción y manejo, bien sean naturales o sintéticos, es la sensibilidad del radical acetilo a la hidrólisis. Un incremento en la estabilidad del sustituyente en posición 9 del ácido siálico proporcionaría una mejor manipulación y, sobre todo, mayor estabilidad del compuesto dentro del organismo vivo, que podría traducirse en una mayor capacidad anti-proliferativa debido al aumento de su vida media. Para aumentar la estabilidad del sustituyente introducido químicamente a los gangliósidos proponemos llevar a cabo una modificación

que estabilizaría la estructura de la neurostatina más que la O-acetilación, como es la O-butilación. Por otro lado, y debido a la importancia de la O-acetilación de la neurostatina en su actividad anti-proliferativa, se estudiará cómo afectan múltiples O-acetilaciones, o múltiples O-butilaciones, a la actividad del gangliósido, sintetizando diferentes derivados de la neurostatina varias veces O-sustituidos.

Todo esto permitirá avanzar en el estudio de los gangliósidos derivados de la neurostatina como posibles inhibidores del crecimiento de tumores del SNC, conocer las características moleculares responsables de la inhibición, analizar su actividad en modelos tumorales *in vivo*, incluso en el ambiente cerebral, y estudiar su mecanismo de acción en la biología de las células sobre las que actúan.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudio de la actividad anti-tumoral de la neurostatina y de sus derivados O-butilados sobre los gliomas, descripción de su potencial implicación en la regulación de la proliferación tumoral y en la inducción de apoptosis, y evaluación de sus mecanismos de acción moleculares.

Objetivos específicos

- 1) Obtención de neurostatina semi-sintética y sus derivados multi-acetilados mediante O-acetilación química del gangliósido GD1b, evaluando el efecto de la multi-O-acetilación sobre la actividad anti-tumoral.
- 2) Evaluación del efecto de la sustitución de radicales O-acetilo por radicales O-butilo en los derivados de GD1b sobre la estabilidad del compuesto y la actividad anti-tumoral.
- 3) Descripción del efecto de la neurostatina y su derivado O-butilado sobre el crecimiento de xenotransplantes de gliomas en ratones desnudos. Estudio del potencial efecto de los compuestos sobre la proliferación tumoral y el ciclo celular.
- 4) Descripción del efecto de la neurostatina y su derivado O-butilado sobre el crecimiento de alotransplantes intracraneales de glioma en rata. Estudio del potencial efecto de los compuestos sobre la proliferación tumoral, la apoptosis y la interacción con el sistema inmune.
- 5) Determinación del potencial efecto de la neurostatina sobre el control del ciclo celular durante la proliferación de las células de glioma. Estudio del efecto de la neurostatina sobre las proteínas reguladoras de la progresión de la división celular.
- 6) Determinación del potencial efecto de la neurostatina sobre la regulación de la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico en células de glioma, así como de las vías de señalización que controlan el crecimiento celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de cultivos celulares se emplearon tanto embriones (estadío E17) como individuos postnatales (estadío P0-P1) de rata Wistar criados en la colonia del Instituto Cajal (CSIC), y mantenidos con alimento y bebida *ad libitum*, en un ciclo de luz/oscuridad, a humedad y temperatura constantes.

Para los experimentos *in vivo* se emplearon ratones hembra atímicos de la cepa Foxn1^{nu/nu} de 6 semanas de edad y ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 6-8 semanas de edad (Harlan Iberica, Barcelona, España). Los animales fueron mantenidos en el estabulario del Instituto Cajal en jaulas con cobertor y con alimento y bebida *ad libitum*, en un ciclo de luz/oscuridad, a humedad y temperatura constantes.

Los protocolos experimentales se ajustaron a las normativas españolas de cuidado y manejo de animales de experimentación (Real Decreto 1201/2005) y de la Unión Europea (86/609/EEC), y fueron aprobados por la comisión de cuidado animal del Instituto Cajal.

2. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

2.1. Método de O-acetilación y O-butilación química de gangliósidos

Los gangliósidos comerciales GD1b (Alexis, Lausen, Suiza) fueron modificados químicamente según el protocolo descrito por Ogura *et al.*, (1987), modificado posteriormente para gangliósidos (Hubl y cols., 2000). Se introdujeron radicales acetilo y butirilo en la estructura de dichos gangliósidos mediante reacciones de O-acetilación y O-butilación, respectivamente. La O-sustitución ocurre regioselectivamente en la posición 9 del ácido siálico externo del gangliósido. El tiempo de reacción y la concentración de sustituyente fueron evaluados previamente, con el fin de encontrar las condiciones óptimas para obtener las especies de GD1b mono-sustituidas.

O-Acetilación y O-Butirilación química de GD1b

Para poner a punto la reacción de O-acetilación, el gangliósido GD1b (125µg) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU; 12,5µl) fue tratado con trimetilortoacetato (TMOA; Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) en exceso molar de 500 o 1000 veces, en presencia de ácido p-toluenosulfónico (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU; 0,0125 mg) como catalizador. La reacción fue mantenida 8, 16, 24 o 48h horas en oscuridad, a una temperatura de 18, 21 o 25°C y detenida añadiendo metanol (1ml). El producto de reacción fue desalado, secado y almacenado.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de O-acetilación (ver resultados apdo. 1.1.2), se realizó la reacción de O-butilación, empleando trimetilortobutirato (TMOB; Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) como donador.

Desalado de las muestras

La mezcla de reacción fue desalada inmediatamente mediante filtración en cartucho de fase reversa (Sep-Pak Plus C18; Waters, Milford, UK) según el protocolo de Williams y McCluer (1980). Brevemente, el cartucho fue activado con 20 ml de mezcla de cloroformo/metanol (2/1, v/v), seguido de 20 ml de metanol y de otros 20 ml de cloroformo/metanol/agua (3/48/47, v/v/v). La muestra fue ajustada a la proporción (3/48/47, v/v/v) de cloroformo/metanol/agua, aplicada al cartucho de SepPak plus C18 (Waters, Milford, EEUU) y el cartucho lavado con 20 ml de agua para eliminar las sales. La muestra desalada se eluyó con 20 ml de metanol y fue secada al vacío en speed-vac (Savant, Kent City, EEUU). El producto seco se almacenó a -20°C hasta su utilización.

2.2. Técnicas cromatográficas

Cromatografía en capa fina (TLC)

Para visualizar, purificar y cuantificar los gangliósidos obtenidos como producto de las reacciones de O-acetilación y O-butilación, se desarrollaron cromatografías en capa fina (TLC).

Los productos de reacción fueron disueltos en metanol y se realizaron cromatografías en capa fina (TLC) analíticas, en placas de aluminio de 20x20 cm cubiertas de silicagel 60 (Merck, Darmstadt, Alemania), junto con una mezcla patrón de gangliósidos comerciales (GT1b, GD1b, GD1a y GM1; Alexis, Lausen, Suiza). Las cromatografías fueron desarrolladas durante 40 minutos en una fase móvil compuesta de cloroformo/metanol/CaCl₂ 0.2%, en proporción (45/55/10, v/v/v), en una cubeta de vidrio.

Las placas fueron reveladas por pulverización con ácido sulfúrico al 3.5% en metanol y calentamiento a 120-140°C durante 5 minutos. El factor de retención (R_f) de las bandas fue calculado como la relación entre la distancia migrada por el gangliósido a separar y la distancia migrada por el frente cromatográfico.

Para purificar y extraer los gangliósidos de interés se realizaron TLC preparativas. Las placas fueron desarrolladas del mismo modo que anteriormente, revelándose únicamente los carriles centrales, usándolos de patrón para identificar las bandas correspondientes a los gangliósidos. Las bandas a extraer fueron recortadas y eluidas en metanol, con rotación en noria durante 2 horas a 4°C, retirando los restos de silicagel por centrifugación (12000 g, 5min, 4°C). Posteriormente se realizaron desalaciones por cromatografía en cartuchos Sep-Pak Plus C18 como se describe en el apartado anterior (apdo. 2.1.). Los productos fueron desalados y secados al vacío en speed-vac (Savant, Kent City, EEUU) y almacenados a -20°C.

Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)

Los gangliósidos modificados, resuspendidos en metanol, fueron cuantificados mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), en placas de cristal (10x10) cubiertas de silicagel 60 (Merk, Darmstadt, Alemania). Se desarrollaron en la misma fase móvil descrita anteriormente, compuesta de cloroformo/metanol/CaCl₂ 0.2%, en proporción (45/55/10, v/v/v), en una cubeta de vidrio durante 14 minutos y se revelaron de igual modo que el

descrito anteriormente, empleando un patrón de GD1b (Alexis, Lausen, Suiza) a concentración conocida y comparando la densidad óptica de las bandas reveladas en un densitómetro (Bio-Rad, Munich, Alemania).

2.3. Técnicas de análisis molecular

Espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI TOF-TOF)

Los gangliósidos obtenidos fueron caracterizados por espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). El análisis se realizó en un espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystem, Framingham, CA, USA), equipado con un laser Nd:YAG de 200 Hz y una longitud de onda de 355 nm. Se depositó en placa 0,5 µl de una mezcla de proporciones 1:1 (v/v) de muestra disuelta en metanol con la matriz, formada por ácido 2,5-dihidroxibenzoico (10 mg/ml metanol).

Los espectros de masas se registraron en modo reflector negativo en un intervalo de masa de 1000 a 3000 umas y una masa de enfoque de 1900 umas. En cada espectro se acumularon 2400 disparos. Previo al análisis, el espectrómetro se calibró utilizando una mezcla de péptidos (angiotensina I, sustancia P, bombesina, ACTH clip (1-17), ACTH clip (18-39)). La identificación de los gangliósidos presentes en la muestra se realizó en base a estudios anteriores (Sugiyama *et al.*, 1997).

El peso molecular de un gangliósido varía en función de la composición de la ceramida que posee en su estructura. Las ceramidas más frecuentes en estos gangliósidos contienen una esfingosina de 18 átomos de carbono con una insaturación (18:1), o una esfingosina de 20 átomos de carbono con una insaturación (20:1). Ambas ceramidas contienen un ácido graso saturado de 18 átomos de carbono (18:0). Además, los gangliósidos pueden presentar en su estructura un ión sodio que añade 23 unidades de masa a los gangliósidos, con sus diferentes posibilidades de ceramida. En la tabla S1 se muestran los pesos moleculares teóricos de las diferentes especies de los derivados O-acetilados y O-butilados de GD1b.

Electrospray-MS

Los gangliósidos obtenidos por síntesis química fueron caracterizados mediante la técnica de Electrospray. Para ello se disolvieron en metanol (LC-MS; Scharlau, Barcelona, España) y se infundieron en una fuente iónica a través de un emisor mantenido a alto potencial (de -2 a -4,5 kV) para formar las gotas cargadas.

Los espectros de masas fueron adquiridos en modo iónico negativo en un Qtrap 4000 (Applied biosystems, Foster City, EEUU) equipado con un Turbo V™ o una fuente NanoSpray® II con una sonda ESI controlada por el software Analyst 1.4.2.

La adquisición en scan EMS (rango de m/z 500-2000) fue realizada utilizando un potencial de desagrupamiento de -130V, y fuente de gas 1 y gas de cortina fijados a 20 y 10 respectivamente. La adquisición de datos de MS/MS (Enhanced Product Ion) fue realizada a una tasa de escaneo de 1000amu/s, utilizando los mismos parámetros de ionización y

aplicando una energía de colisión de -45eV, con una distribución de energía de colisión de 5eV.

Hidrólisis Alcalina

Para comparar la diferente resistencia a la hidrólisis alcalina de los gangliósidos modificados, los compuestos O-Ac GD1b y O-But GD1b (2µg) se incubaron en NaOH (16µl; 10mM en metanol) a 24°C durante diferentes tiempos (5 y 20 minutos). A continuación se neutralizaron con 16µl de ácido acético (10mM en metanol), se secaron en speed-vac y se desalaron por cromatografía en cartucho de C18 (PepLean C18 Spin Columns; Termo scientific, Rockford, EEUU) del mismo modo que con los cartuchos SepPak plus C18 (apdo. 2.1.) ajustando el volumen a 200µl. Finalmente se desarrollaron HPTLCs analíticas y las bandas se cuantificaron, para calcular la tasa relativa de hidrólisis que había tenido lugar.

3. TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES

3.1. Cultivo de líneas tumorales

En este estudio se emplearon la línea tumoral de astrocitoma humano de grado III U-373MG, la línea de glioma de rata C6 y la línea transfectada de glioma de rata C6GFP. Tanto la línea celular U373MG como la C6, han sido ampliamente empleadas para el estudio de la patología tumoral en el SNC (Yamamoto y cols., 2001; Grobбен y cols., 2002). El cultivo de las tres líneas fue similar, manteniéndose hasta crecimiento exponencial a partir de viales almacenados en nitrógeno líquido. Se cultivaron en frascos de cultivo con medio DMEM (DMEM7777, Sigma-Aldrich, St Louise, EEUU) suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (SFBi; GLinus, Madrid, España), 2g/l de bicarbonato sódico (Merck, Darmstadt, Alemania), penicilina (50 IU/ml; Sigma-Aldrich, St Louise, EEUU) y estreptomycin (50 µg/ml; Sigma-Aldrich, St Louise, EEUU), a pH 7.2, en un incubador a 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂ saturada de vapor de agua.

Cuando alcanzaron la confluencia se procedió a dar un pase a las células o a sembrarlas en los soportes adecuados para la realización del procedimiento experimental correspondiente. Para ello, se levantaron con Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) en tampón fosfato-salino (PBS), incubando 5 minutos a 37°C. La reacción de la tripsina fue detenida con DMEM suplementado con 10% SFBi, centrifugándose las células 5 minutos a 1000 rpm y se volvieron a sembrar o bien se congelaron a -80°C en viales de congelación con 1 millón de células en DMSO con 10%SFBi.

3.2. Cultivo de astroblastos de corteza postnatales

Para obtener el cultivo se utilizaron ratas Wistar postnatales recién nacidas o con un día desde su nacimiento (P0-P1) y se siguió un protocolo similar al descrito previamente por McCarthy (McCarthy and De Vellis, 1980).

Se procedió a decapitar a los animales y extraer sus cortezas cerebrales en solución de Hanks suplementada con Ca^{2+} y Mg^{2+} (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU). Tras eliminar las meninges y la sustancia blanca, se pasó cada corteza de una rata a un mililitro de medio DMEM F12 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), penicilina (50 IU/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) y estreptomicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU). El tejido fue disociado mecánicamente con una pipeta de vidrio, evitando la formación de burbujas, y se pasó por un filtro de 40 micras, para sembrar el filtrado en frascos de cultivo recubiertos de poli-L-lisina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El cultivo se mantuvo en un incubador a 37°C, en atmósfera de 5% de CO_2 saturada de vapor de agua. Se cambió el medio de cultivo a las 48 horas y después cada tres días o cuando el indicador de pH mostró acidificación del medio de cultivo.

Tras 8-12 días en cultivo, se procedió a eliminar del cultivo otros tipos celulares (oligodendrocitos, microglía y neuronas) sometiendo los frascos a agitación constante a 280rpm y 37°C durante 18 horas. Se descartaron las células en flotación y las células adheridas se levantaron con Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU). Se inhibió la enzima añadiendo medio de cultivo con suero, se centrifugaron 10 minutos a 1000rpm y se sembraron en los soportes adecuados para su utilización experimental posterior.

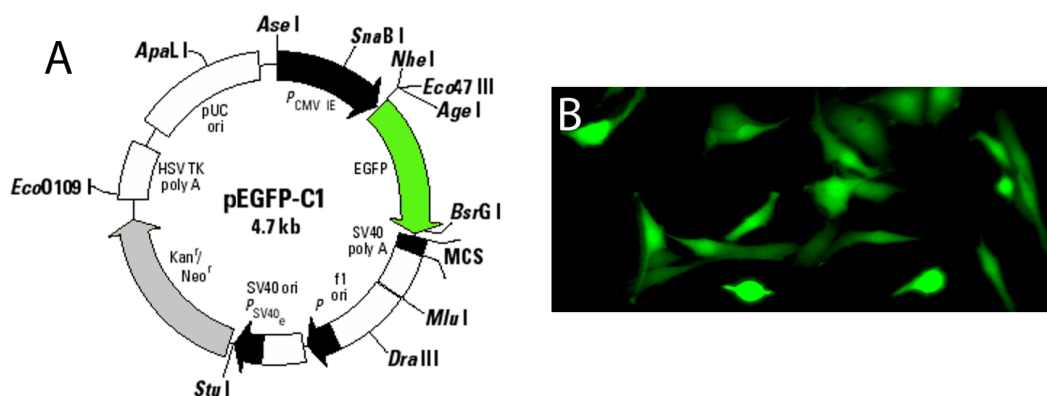
3.3. Cultivo de neuronas de corteza embrionarias

Las neuronas fueron obtenidas a partir de cerebros de embriones de rata Wistar de 17 días de gestación (E17). Para ello, se sacrificaron las ratas gestantes por decapitación y se extrajeron sus embriones sobre una solución de Hanks con Ca^{2+} y Mg^{2+} (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU). Se procedió a extraer los embriones del saco vitelino, obteniendo los cerebros y de ellos las cortezas cerebrales, eliminando cuidadosamente las meninges y la sustancia blanca. El tejido se cortó en pequeños trozos en solución Hanks' sin Ca^{2+} y Mg^{2+} (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) suplementada con 0.25% de tripsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) y DNAsa (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Roche, Mannheim, Alemania), incubando en un baño a 37°C durante 10 minutos. A continuación se inhibió la actividad de la enzima añadiendo medio de cultivo con suero y se disgregó el tejido mecánicamente con ayuda de una pipeta de vidrio. Finalmente, las células se centrifugaron 5 minutos a 1000 rpm y se resuspendieron en medio de cultivo Neurobasal (Gibco; Paisley, EEUU) suplementado con B27 (1%v/v; Gibco; Paisley, EEUU), glutamina (1mM; Gibco; Paisley, EEUU), penicilina (50 IU/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis) y estreptomicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU). La solución se pasó por un filtro de 40 μm (Falcon, Le Pont de Claix, Francia), para proceder a contar las células y sembrarlas en los soportes adecuados para la realización del procedimiento experimental correspondiente.

4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

4.1. Transfección de la línea de glioma de rata (C6)

En una placa de 6 pocillos se añadieron por pocillo 100µl de DMEM, 2µl de Fugene (Roche, Mannheim, Alemania) y 2µg del plásmido pEGFP-C1 (Fig. 7A). Como control de la transfección se dejaron unos pocillos solo con medio DMEM. Al cabo de 30 minutos, durante los cuales los plásmidos aparentemente se introdujeron en los liposomas, se añadieron 100000 células C6 en DMEM suplementado con 10% de SFBi, incubándose durante 48 horas. Pasado ese tiempo, se cambió el medio y se le añadió medio DMEM con 10% de SFBi suplementado con el antibiótico geneticina (G-418 Phosphate; Gibco, Paisley, EEUU) a una concentración de 800µg/ml, con el fin de seleccionar las células que habían integrado el plásmido. Cuando las células del control negativo de la transfección comenzaron a morir, se revisó la placa al microscopio de fluorescencia. Las colonias que habían incorporado el plásmido (verdes) se clonaron y amplificaron, cambiando la mitad del medio por medio fresco con suero más el antibiótico geneticina cuando fue necesario. Una vez amplificada la nueva línea de células C6 transfectadas con EGFP (Fig. 7B), se crecieron con medio DMEM con 10% de SFBi, sin el antibiótico geneticina, a fin de comprobar que el DNA del plásmido se había integrado en el genoma y se congelaron a -80°C en viales de congelación con 10⁶ células en DMSO con 10% de SFBi, hasta su posterior utilización.



Estructura del plásmido pEGFP-C1(A), utilizado para transfectar las células de la línea tumoral de glioma de rata C6 (B).

La actividad anti-proliferativa de los gangliósidos sintetizados se evaluó en líneas tumorales cerebrales tanto de rata (glioma C6) como de humano (astrocitoma de grado III U373MG), y en astroblastos de cerebro de rata. Los ensayos en C6 y U373MG fueron llevados a cabo en placas de plástico de 96 pocillos (Falcon, Le Pont de Claix, Francia), sembrando

5000 células / pocillo en medio DMEM con 10% SFBi. Los ensayos con astrocitos se realizaron en placas de plástico de 96 pocillo previamente recubiertos de poli-L-lisina (10µg/ml; Sigma-Aldrich, St Louise, EEUU), sembrando 10000 células/pocillo en medio DMEM F12 con 10% SFBi.

Tras permitir la adhesión al sustrato de las células durante 6 horas para las líneas tumorales y 24 horas para los astrocitos, se incubaron con su correspondiente medio sin suero durante 36 horas. Posteriormente, se retiró el medio y se añadieron diluciones seriadas (desde 9µM hasta 15nM) de los gangliósidos a testar en el medio correspondiente a cada tipo celular, suplementado con el mitógeno EGF (Human EGF, PeproTech, Rocky Hill, EEUU) a una concentración de 10 ng/ml durante 24 horas. Como control negativo de proliferación las células fueron tratadas con medio de cultivo y como control positivo con medio suplementado con EGF (10 ng/ml). Como control adicional de los experimentos se ensayó la actividad de la droga Temozolomida (TMZ, Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) a diferentes concentraciones, bajo las mismas condiciones, en las líneas celulares tumorales U373MG y C6.

Para evaluar la proliferación celular se utilizó el método de reducción de bromuro de 3,4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazan. Se retiró el medio, que contenía los tratamientos, y se añadió MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) a una concentración de 5mg/ml en medio RPMI 1640 sin rojo fenol (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU), para evitar interferencias en la medición de absorbancia. A las 4 horas, los cristales de formazan fueron solubilizados con SDS (sodium dodecyl sulfate, 1g; Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) en HCl 0,01M de 4 a 18 horas, tras lo cual se efectuó la lectura de la absorbancia de la placa a una densidad óptica (DO) de 595 nm. Los valores obtenidos (n=4) se ajustaron restándoles el control de absorbancia interno de la placa (pocillos en los que no había células), y se ponderaron tomando como 100% de proliferación el valor medio del control positivo descrito anteriormente. Se realizó una representación logarítmica (Fig. S1), y se obtuvo la ecuación de la recta para así poder calcular la concentración a la que se inhibe la proliferación del 50% de las células, o dosis inhibitoria 50 (ID₅₀), del gangliósido testado. Cada ensayo de reducción de MTT se realizó al menos en tres ocasiones con una n de 4 cada vez.

4.3. Evaluación de la supervivencia neuronal por el método de reducción de MTT

Los ensayos fueron llevados a cabo en placas de plástico de 96 pocillos (Falcon, Le Pont de Claix Francia) previamente recubiertos de poli-L-lisina (10µg/ml; Sigma-Aldrich, St Louise, EEUU), sembrando 20000 neuronas por pocillo en medio Neurobasal, suplementado con B27 (1%v/v) y L-glutamina (1mM). Las neuronas se mantuvieron hasta su maduración durante cinco días, cambiando la mitad del medio cada dos días. Posteriormente, se retiró la mitad del medio y se añadieron diluciones seriadas (desde 4,5µM hasta 15nM) de los gangliósidos a testar en la mitad de medio fresco durante 24 horas. Como control negativo de proliferación las células fueron tratadas con medio Neurobasal y como control positivo con medio Neurobasal suplementado con B27 y L-glutamina.

Para medir la supervivencia neuronal se utilizó el método de reducción de bromuro de 3,4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazan. Se retiró el medio y se añadió

MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) a una concentración de 5mg/ml en medio Neurobasal sin rojo fenol con B27 y L-glutamina, para evitar interferencias en la medición de absorbancia. A las 4 horas, los cristales de formazan fueron solubilizados con SDS (sodium dodecyl sulfate, 1g; Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) en HCL 0,01M de 4 a 18 horas, tras lo cual se efectuó la lectura de la absorbancia de la placa a una densidad óptica (DO) de 595 nm. Los valores obtenidos (n=4) se ajustaron restándoles el control de absorbancia interno de la placa (pocillos en los que no había células). Cada experimento fue replicado en 3 ocasiones.

4.4. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

El análisis del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo, marcando las células con ioduro de propidio. Se sembraron 500000 células por pocillo de la línea a estudio, astrocitoma humano (U373MG) o glioma de rata (C6), en placas de 6 pocillos (Falcon, Le Pont de Claix, Francia) en medio DMEM con 10% de SFBi. Tras permitir la adhesión al sustrato de las células durante 6 horas, se incubaron con medio DMEM sin suero durante 36 horas. Posteriormente, se retiró el medio y se añadieron los tratamientos, el gangliósido O-Ac GD1b a una concentración de 2 μ M en medio DMEM con EGF (Human EGF; 10 ng/ml; PeproTech, Rocky Hill, EEUU) y el gangliósido O-But GD1b a una concentración de 2 μ M en medio DMEM con EGF. Como control negativo se usó medio DMEM y como control positivo con el mitógeno EGF en medio DMEM. Los tratamientos se incubaron durante 24 horas.

Las células se disociaron con tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU) y se recogieron junto con el medio de cultivo, se centrifugaron y se fijaron con etanol al 70% gota a gota. Tras centrifugación, se lavó con PBS el pellet de células y se resuspendió en 300 μ l de PBS. Se trataron las células con RNasa (50U; Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) 15 minutos a 37°C y se marcó con ioduro de propidio (25mg/ml; Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU). Las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Fullerton, EEUU).

5. MODELOS EXPERIMENTALES TUMORALES EN ANIMALES

5.1. Xenotransplantes de tumores en ratones Foxn1^{nu/nu}

Los ratones nude o desnudos (Foxn1^{nu/nu}) se caracterizan por no tener un timo maduro, mostrando un sistema inmune deprimido y posibilitando el trasplante de células de otras especies animales sin ocasionar problemas de rechazo. De este modo, a partir de una línea tumoral humana (U373MG) y otra de rata (C6) podemos desarrollar astrocitomas humanos y gliomas de rata en ratones y así obtener un modelo experimental *in vivo* para poder evaluar la eficacia de diferentes tratamientos anti-tumorales.

Se implantaron células de las líneas de glioma de rata C6 y de astrocitoma humano U373MG en el flanco de ratones desnudos Foxn1^{nu/nu}. Para ello se cultivaron las líneas citadas hasta crecimiento exponencial y se tripsinizaron, después de lavar varias veces con PBS. Se Inyectaron en el flanco de ratones desnudos hembra, previamente anestesiados mediante anestesia inhalatoria con isoflurano (4%), con una aguja de 30G a razón de 3x10⁶ células en 200 μ l de medio DMEM.

Los tumores se dejaron crecer hasta alcanzar un tamaño de $120\text{mm}^3 \pm 50\%$. A continuación, se dividieron los animales al azar en los cuatro grupos experimentales ($n=8$), que fueron tratados con vehículo (PBS; $20\mu\text{l}$), o con los gangliósidos GD1b, O-Ac GD1b u O-But GD1b, disueltos en vehículo ($20\mu\text{L}$). Se administraron $40\mu\text{g}$ de compuesto por kg de animal, disuelto en PBS y repartido en varias dosis inyectadas intra-tumoralmente cada dos (U-373MG; 4 dosis) o tres (C6; 5 dosis) días dependiendo de la evolución del tumor. El volumen tumoral de los animales fue monitorizado cada dos-tres días mediante un calibre digital (Vogel, Kevelaer, Alemania), y calculado según la formula $\text{largo} \times \text{ancho}^2 \times \pi/6$. Al mismo tiempo, el peso de los animales fue monitorizado cada día para controlar su buen estado de salud. Los experimentos se prolongaron en el tiempo hasta que los tumores comenzaron a presentar escarificaciones o la salud del animal se vio comprometida, momento en el que los animales fueron sacrificados.

Tratamiento agudo de xenotransplantes de glioma de rata

Alternativamente a lo descrito, se llevaron a cabo experimentos de tratamiento agudo de los tumores implantados en los ratones desnudos. Células de la línea de glioma de rata (C6) fueron implantadas en el flanco de ratones desnudos hembra $\text{Foxn1}^{\text{nu/un}}$, como se describe anteriormente, dejando crecer los tumores hasta alcanzar un tamaño de $120\text{mm}^3 \pm 50\%$. A continuación se dividieron los animales al azar en tres grupos experimentales ($n=6$), que fueron tratados con una única inyección intra-tumoral de PBS ($20\mu\text{l}$ por ratón; grupo control negativo) o con $5\mu\text{g}$ de los gangliósidos, O-Ac GD1b u O-But GD1b (en $20\mu\text{l}$ de PBS) por ratón. Los ratones recibieron, adicionalmente, cuatro inyecciones intra-peritoneales de BrdU ($7,5\text{mg/ml}$) disuelto en tampón Tris-HCl ($0,1\text{M}$, pH 7,6) repartidas en las 30 horas siguientes al tratamiento. Tras este periodo, los animales fueron sacrificados y las muestras de tumores procesadas para el análisis de la expresión proteica, tanto por inmunohistoquímica como por western blotting.

5.2. Alotransplantes intra-estriatales de glioma de rata

Este modelo experimental consistió en el desarrollo de tumores de glioma de rata en el estriado de ratas macho (Sprague Dawley). Para ello, las ratas fueron anestesiadas con anestesia inhalatoria de isoflurano (4% para la inducción 1,5% para mantenimiento), se les rasuró el pelo de la zona craneal y se colocaron en un aparato estereotáxico (Stoelting, Word Dale, EEUU). Se limpió la zona a intervenir y se realizó una incisión en la piel, con un bisturí ($n^\circ 11$), de unos 5mm de longitud, en la zona media de la cabeza hasta visualizar el cráneo. Se separaron las capas de tejido conjuntivo y periostio y, una vez localizadas las suturas coronal y sagital, se practicó un pequeño orificio en el hemisferio derecho, en bregma 3,0 ML, 0,2 AP, con un taladro de dentista hasta visualizar la corteza cerebral. Se inyectaron 1×10^6 células C6, o alternatively C6-GFP, con ayuda de una jeringa de $5\mu\text{l}$ (Hamilton 85 RN, Bonaduz, Suiza), en $5\mu\text{l}$ de DMEM a 4,5 mm de profundidad y a un flujo de inyección de $0,5\mu\text{l/min}$. Finalmente, se suturó el tejido conjuntivo con sutura absorbible de ácido poliglicólico (Surgicryl, Hünningen, Bélgica) y la piel del cráneo se suturó con hilo de seda de 3/0 (Lorca-

Marín, Murcia, España). Tras la cirugía los animales recibieron una dosis subcutánea de antibiótico Baytril (Bayer, Kiel, Alemania; 300µl/Kg) cerca de la zona de incisión.

Con el fin de averiguar el tiempo que tardaba el glioma en establecerse, y la ventana de tiempo en la que el glioma se encontraba adecuadamente establecido en el estriado, se sacrificaron animales a los 7, 14 y 21 días post-inyección de las células tumorales. En base al crecimiento observado, se determinó el día 7 como el adecuado para proceder al tratamiento.

El tratamiento se administró intra-estriatalmente mediante una jeringa Hamilton, a través del mismo orificio abierto en el cráneo que se utilizó para implantar las células. Para ello, al cabo de siete días de la inyección de las células tumorales, se dividieron los animales en cuatro grupos experimentales (n=7). El procedimiento seguido para el tratamiento fue similar al anteriormente descrito. Los animales se anestesiaron con Isoflurano, se colocaron en el estereotáxico, se practicó una incisión y se expuso el orificio practicado en la anterior operación. Se inyectaron los tratamientos intra-estriatalmente (ML 3,0, AP 0,2, DV 4,5 de bregma) a cada grupo mediante una jeringa Hamilton. Los tratamientos fueron: PBS (5µl) en el grupo control, o los gangliósidos GD1b, O-Ac GD1b u O-But GD1b en una sola dosis de 5µg en 5µl de PBS por rata. Tras el tratamiento, se suturaron las incisiones y los animales recibieron una dosis de antibiótico subcutáneo cerca de la zona de incisión.

Los animales fueron sacrificados a las 48 horas del tratamiento y los cerebros procesados adecuadamente para llevar a cabo las técnicas inmunohistoquímicas descritas a continuación.

6. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

6.1. Inmunodetección de proteínas

Obtención de muestras de proteína de células en cultivo

La extracción de proteína se llevó cabo en células de la línea de astrocitoma humano U373MG. Se sembraron 200000 células/pocillo en placas de 6 pocillos (Falcon, Le Pont de Claix, Francia) en medio DMEM suplementado con 10% de SFBi. Tras permitir la adhesión al sustrato de las células durante 6 horas, se incubaron con medio DMEM sin suero durante 36 horas.

Posteriormente, se retiró el medio y se añadió medio DMEM o medio DMEM con el gangliósido O-Ac GD1b a una concentración de 2µM. Una hora después, se añadió el mitógeno EGF (Human EGF, PeproTech, Rocky Hill, EEUU) a una concentración de 10 ng/ml (excepto al control negativo) y se incubó diferentes tiempos: 0 minutos (control sin EGF), 5, 15, 30 minutos (EGF o EGF+O-Ac GD1b), 12, 24 y 48 horas (EGF o EGF+O-Ac GD1b).

La extracción de proteína de las muestras se realizó empleando 50µl de tampón de lisis (EDTA 1mM, NaCl 137mM, NP-40 1%, glicerol 10%, DTT 0.5mM, ortovanadato sódico 10mM en tampón Tris-HCl 20mM pH 7.2) suplementado con un cocktail de inhibidores de fosfatasa y proteasas (PhosStop y Complete Mini; Roche, Mannheim, Alemania), utilizando un rascador (Sarstedt, Newton, EEUU), a 4°C, previo lavado con PBS estéril. La suspensión se pasó por una

jeringa de 0.5x16mm para romper los núcleos, seguido de centrifugación (12000g, 10min, 4°C), recogiendo el sobrenadante. Posteriormente se cuantifico la concentración de proteína mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976).

Obtención de muestras de proteína de tejido fresco

Los extractos de proteína de los tumores implantados en los ratones desnudos Foxn1^{nu/un} se obtuvieron previa perfusión con suero salino (0.9%), para eliminar restos de sangre (ver apdo 7.2). Los tumores subcutaneos se diseccionaron, se congelaron en hielo seco y se homogeneizaron mecánicamente (Ultra Turrax T25, IKA, Staufen, Alemania) en tampón de lisis (EDTA 1mM, NaCl 137mM, NP-40 1%, glicerol 10%, DTT 0.5mM, ortovanadato sódico 10mM en tampón Tris-HCl 20mM pH 7.2) suplementado con un cocktail de inhibidores de fosfatasas y proteasas (PhosStop y Complete Mini; Roche, Mannheim, Alemania) a 4°C. A continuación, se sonicaron y centrifugaron (12000g, 10min, 4°C) para eliminar restos insolubles y de DNA.

Posteriormente, se cuantificó la concentración de proteína mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976), usando albúmina bovina (BSA; Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU) como patrón y empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595nm (WPA, Cambridge, Reino Unido). Se almacenaron las muestras a -80°C hasta su utilización.

Electroforesis de proteínas, transferencia a nitrocelulosa e inmunodetección (Western blot)

Para llevar a cabo el proceso de inmunodetección de proteínas se realizaron electroforesis SDS-PAGE (SDS-PolyAcrylamide-Gel-Electrophoresis). Se prepararon geles de poliacrilamida (tampón Tris-HCl) con fase concentradora y fase separadora con diferente tamaño de poro (6, 7.5, 10 y 12.5% de poliacrilamida; Tabla 1), dependiendo del rango de proteínas a separar. Las muestras fueron preparadas en tampón de carga (Tris-HCl 50mM, pH 6.8, 10% SDS, 10% glicerol, 3% 2-mercaptoetanol, 0.005% azul de bromofenol) y calentadas a 100°C durante 10 minutos, con el fin de solubilizar y reducir las proteínas. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente en cubetas (Hoefer SE 280, San Francisco, EEUU), aplicando 15-30µg de proteína/pocillo, con una intensidad de corriente de 15-20mA por gel, en un tampón de electroforesis Tris-HCl (pH8.3, 0.1% SDS, glicina). Paralelamente, se aplicó un patrón de pesos moleculares (Bio-Rad, Munich, Alemania) para la correcta identificación del peso molecular de las proteínas.

Una vez separadas las proteínas de la mezcla mediante SDS-PAGE, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (western blotting). Brevemente, el gel se colocó sobre una membrana (nitrocelulosa 0.2µm), situándose entre varias hojas de papel Whatman 3MM, dos esponjas porosas y dos soportes de plástico. Posteriormente, se colocó en una cubeta de transferencia (Hoefer TE22, San Francisco, EEUU) y se sumergió en un tampón de transferencia (Tris-HCl, pH8.3, glicina 192mM) con diferente concentración de metanol (5-20%; Tabla 1) y SDS (0-1%) dependiendo del tamaño de las proteínas a transferir, orientándolo para favorecer el paso de las proteínas a la membrana y aplicándose un voltaje de 90-120mA durante una noche a 4°C.

Tamaño de Proteínas	% Gel Poliacrilamida	Tampón de Transferencia
10-60 KDa	12'5%	20% Metanol
40-100 KDa	10%	10% Metanol
60-130 KDa	7'5%	5% Metanol; 0'1% SDS
130-180 KDa	6%	5% Metanol; 0'1% SDS

Tabla 1. Condiciones de western blotting según el tamaño de la proteína de interés. Porcentaje de la fase separadora del gel de poliacrilamida y % de metanol en el buffer de transferencia, en función del tamaño de las proteínas a separar por western blotting.

Tras completar el proceso de transferencia se comprobó la correcta migración mediante tinción reversible con Rojo Ponceau (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU). Tras sucesivos lavados con TBST (TBS+Tween20 0.1%) se bloquearon los sitios de unión inespecífica de los anticuerpos con una solución de leche desnatada al 5% (1 hora, temperatura ambiente). Posteriormente, las membranas fueron lavadas (TBST, 5X) e incubadas con el anticuerpo primario (Tabla 2) durante 2 horas a temperatura ambiente o una noche a 4°C en agitación en TBST con 5% de leche desnatada o de albúmina bovina (BSA; Sigma-Aldrich, St Louis, EEUU; Tabla 2). Seguidamente se lavó la membrana (TBST, 5X) y se procedió a su incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG (de ratón o conejo), conjugado a peroxidasa de rábano (HRP; Tabla 2) durante 1 hora a temperatura ambiente en TBST o en solución de bloqueo.

La detección de la señal se realizó incubando la membrana con un sustrato quimioluminiscente (Supersignal WestPico o WestFento Chemiluminiscent substrate; Pierce, Rockford, EEUU), capturando la señal mediante un sistema de adquisición de imagen (Versadoc, Bio-Rad, Munich, Alemania), y realizando el análisis densitométrico de las bandas con el software Quantity One 4.2 (The discovery series, Bio-Rad, Munich, Alemania).

Los western blots para la detección de cada proteína fueron replicados varias veces y a partir de muestras de proteína procedente de al menos 3 experimentos diferentes y siempre en paralelo con un control de carga (GAPDH o α -actinina).

En algunas ocasiones, las membranas en las que ya se había detectado alguna proteína fueron tratadas para retirar los anticuerpos, permitiendo nuevas incubaciones con anticuerpos diferentes (técnica de stripping). Para ello se incubaron las membranas durante 30 minutos a 70°C en tampón Tris HCl 62,5mM, pH 6.8, con SDS (2%) y 2-mercaptoetanol (0,1M). Las membranas se lavaron con TBST 6 veces y se comprobó que no se detectaban los anticuerpos incubados con anterioridad, continuando con la incubación del siguiente anticuerpo primario.

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución	Observaciones*
Mouse α -p21 ^{Waf1/Cip1}	Cell Signaling	1:2000	5% de leche desnatada
Rabbit α -p27 ^{Kip1}	Cell Signaling	1:1000	5% de BSA
Mouse α -Ciclina D1	Cell Signaling	1:2000	5% de leche desnatada
Mouse α -Ciclina D3	Cell Signaling	1:2000	5% de leche desnatada
Mouse α -Ciclina A	Sigma-Aldrich	1:1000	5% de BSA
Mouse α -CDK4	Cell Signaling	1:2000	5% de leche desnatada
Mouse α -CDK6	Cell Signaling	1:2000	5% de leche desnatada
Mouse α -Human Rb	BD Biosciences	1:500	5% de BSA
Rabbit α -Phospho Rb (Ser780)	Cell Signaling	1:1000	5% de BSA
Rabbit α -Phospho Rb (Ser795)	Cell Signaling	1:1000	5% de BSA
Rabbit α -Phospho Rb (Ser807/811)	Cell Signaling	1:1000	5% de BSA
Rabbit α -EGFR	Cell Signaling	1:1000	5% de BSA
Rabbit α -Phospho-EGFR (Tyr992)	Cell Signaling	1:1000	5% de BSA
Rabbit α -Phospho-EGFR (Tyr1045)	Cell Signaling	1:1000	5% de BSA
Rabbit α -Phospho-EGFR (Tyr1068)	Cell Signaling	1:1000	5% de BSA
Rabbit α -Shc	Cell Signaling	1:1000	5% de BSA
Rabbit α -Phospho Shc	Cell Signaling	1:1000	5% de BSA
Mouse α -mouse phospho ERK1/2	Sigma-Aldrich	1:1000	----
Rabbit α -mouse ERK1/2	Sigma-Aldrich	1:1000	----
Rabbit α -Phospho- Histone H3 (Ser10)	Upstate	1:500	----
Mouse α -mouse GAPDH	Chemicon	1:2000	----
α -actinina	BD Biosciences	1:2000	----
Goat α -mouse IgG HRP conj.	Cell Signalling	1:2000	----
Goat α -rabbit IgG HRP conj.	Cell Signalling	1:2000	----

Tabla 2 Anticuerpos empleados en western blotting.

Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para western blotting, así como la casa comercial, la dilución empleada y la solución de incubación del anticuerpo (*).

6.2. Análisis de la expresión génica mediante arrays de PCR

Se evaluó el efecto del tratamiento con neurostatina sobre la expresión de ARN mensajero (ARNm) de los genes más relevantes de la patología tumoral en células de una línea tumoral de astrocitoma humano. Para ello se emplearon PCR arrays (RT² Profiler PCR Array System, Cancer Pathway Finder, SA Biosciences, Frederick, EEUU), tecnología que permite la cuantificación de la expresión génica de 96 genes (84 genes de interés y 12 controles internos) implicados en las siguientes funciones: control del ciclo celular y reparación del daño al ADN, apoptosis y senescencia, moléculas de transducción de señales y factores de transcripción, adhesión, angiogénesis, invasión y metástasis.

Las muestras se obtuvieron a partir de células de la línea de astrocitoma humano U373MG. Se sembraron 200000 células/pocillo en placas de 6 pocillos (Falcon, Le Pont de Claix, Francia) en medio DMEM con 10% de SFBi. Tras permitir la adhesión al sustrato de las células durante 6 horas, se incubaron con medio DMEM sin suero durante 36 horas.

Posteriormente, se retiró el medio y se añadió medio DMEM o medio DMEM con el gangliósido O-Ac GD1b, a una concentración de 2µM. Una hora después se añadió el mitógeno EGF (Human EGF, PeproTech, Rocky Hill, Londres) a una concentración de 10 ng/ml, se incubó durante 24 horas y se procedió a extraer el ARNm.

Obtención de muestras de ARNm y control de calidad

Los procesos de extracción de ARNm, control de calidad, retrotranscripción y amplificación fueron realizados siguiendo las indicaciones del fabricante (RT² Profiler PCR Array System, Cancer Pathway Finder, SA Biosciences, Frederick, EEUU). Las muestras fueron procesadas para la extracción del ARNm, utilizando el RNAqueous®-Micro Kit con tratamiento con DNasa en columna (Ambion, St. Austin, EEUU) según las indicaciones del fabricante. Seguidamente se procedió a evaluar la calidad de las muestras obtenidas, midiendo su absorbancia a 230, 260 y 280nm en NanoDrop 2000 (Thermo scientific, Wilmington, EEUU), para determinar que los ratios de las muestras cumplieran los siguientes requisitos: $A_{260}/A_{230} > 1.7$, $A_{260}/A_{280} > 2$, con el fin de detectar posibles contaminaciones con ADN genómico, proteína o sustancias orgánicas. Parte de la muestra fue desarrollada en un gel de agarosa al 2%, para comprobar la integridad del ARN ribosómico, evidenciándose la aparición de las bandas 28s y 18s y no mostrando ningún "smear" de ARNm que evidenciaría su degradación.

Obtención de ADNc y cuantificación de la expresión génica mediante Arrays de PCR

Tras comprobar la calidad de las muestras de ARNm, se retrotranscribieron a ADNc mediante el kit RT² First Strand (SA Biosciences, Frederick, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras el paso de retrotranscripción, la muestra de ADNc fue cuantificada y empleada en las placas de arrays de PCR, utilizando 500ng de muestra por placa. La reacción

de PCR fue preparada con el kit RT² qPCR Master Mix (SA Biosciences, Frederick, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante, y cargada en las respectivas placas de PCR array mediante una pipeta multi-canal y puntas con filtro. La detección de Real-Time PCR fue realizada en un equipo ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, EEUU), con un programa de dos pasos: 1 ciclo de 10 min a 95°C y 40 ciclos de 15s a 95°C, seguidos de 1min a 60°C. Posteriormente se obtuvieron los valores de Ct (ciclo umbral; número de ciclo necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base) según el software de Applied Biosystems, y se utilizaron para evaluar las diferencias en expresión y analizar los datos con el software de SA Biosciences. Brevemente, se utilizaron los datos de los controles internos de la placa de presencia de ADN genómico (GDC), los datos de eficiencia de la retrotranscripción (RTC), y el control positivo de PCR (PPC) para evidenciar la calidad del proceso y la validez de cada set de datos para cada muestra. El proceso se repitió con 3 muestras diferentes para cada tratamiento, obtenidas de experimentos independientes (n=3). La expresión de los genes de interés fue promediada con la expresión de 5 genes de expresión constante (housekeeping genes; B2M, HPRT1, RPL13A, GAPDH, ACTB) Los datos se expresan como número de veces de sobre-expresión o represión de cada gen, comparando las muestras EGF/EGF+ neurostatina.

7. TÉCNICAS INMUNOCITOQUÍMICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS

Las técnicas tanto de inmunocitoquímica como de inmunohistoquímica se realizaron por detección indirecta, empleando un anticuerpo primario contra el antígeno específico, y un anticuerpo secundario dirigido frente a la cadena pesada del anticuerpo primario, utilizando controles negativos (ausencia de anticuerpo primario) con el fin de asegurar una correcta identificación del antígeno.

7.1. Método de tinción inmunocitoquímica

Para la detección inmunocitoquímica de epítomos se emplearon células de la línea de astrocitoma humano U373MG crecidas sobre cubreobjetos de cristal de 10mm (Menzer Glaser, Braunschweig, Alemania), en placas de cultivo de 4 pocillos (Greniner bio-one, Frickenhausen, Germany). Se sembraron 5000 células/pocillo en DMEM con 10% de SFBi y se dejaron adherir durante 6h, para seguidamente mantenerlas en medio DMEM sin suero durante 36h. Posteriormente, se retiró el medio y se añadió medio DMEM como control negativo, medio DMEM suplementado con el mitógeno EGF (Human EGF, PeproTech, Rocky Hill, EEUU; 10 ng/ml) como control positivo, o medio DMEM suplementado con el mitógeno EGF (10ng/ml) y con el gangliósido O-Ac GD1b a una concentración de 2µM. El tratamiento se mantuvo durante 24 horas.

El proceso de tinción inmunocitoquímica se realizó sobre células previamente fijadas. Para ello se le añadió paraformaldehído al 2% directamente al medio de cultivo durante 10 minutos, seguido de otros 10 minutos de incubación con paraformaldehído al 2% limpio. Tras realizar 3 lavados con PBS estéril, se llevó a cabo un paso de bloqueo de las uniones

inespecíficas con suero fetal bovino al 4% en PBS (solución de bloqueo; 30min, temperatura ambiente), utilizando Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU; 0.02%) en el caso de epítomos intracelulares. Seguidamente, y tras 3 lavados con PBS, se realizó una incubación de 2 horas a temperatura ambiente ó 24 horas a 4°C con el anticuerpo primario en solución de bloqueo (Tabla 3). Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS, y se emplearon anticuerpos secundarios conjugados a compuestos fluorescentes (Alexa Fluor, Molecular Probes, Leiden, Holanda; Tabla 3), para la visualización del marcaje, en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizó un lavado con PBS y las células fueron adicionalmente marcadas con Hoechst (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU; 1:5000 en PBS 5 minutos en oscuridad) para la detección de sus núcleos. Tras lavar 3 veces más con PBS, los cubreobjetos se montaron con mowiol (La Jolla, EEUU) sobre portaobjetos y estos se almacenaron en oscuridad a 4°C

7.2. Método de tinción inmunohistoquímica

Perfusión de los animales, procesamiento de las muestras y obtención de secciones de tejido

La técnica de marcaje inmunohistoquímica fue realizada sobre tejido fijado por perfusión. Las ratas fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico (50mg/kg peso corporal), para proceder a administrar, a través de la arteria aorta, una solución salina (0.9% NaCl en H₂O, suplementada con 0.08% heparina al 5%) para retirar la sangre. Seguidamente los animales se perfundieron con una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M, pH7.4 para, finalmente, extraer las muestras por disección. Los tejidos fueron post-fijados por inmersión en paraformaldehído al 4%, durante 18 horas a 4°C.

Alternativamente, se realizaron estudios inmunohistoquímicos sobre tejido fijado por inmersión cuando parte de dicho tejido se destinó a la realización de estudios de biología molecular, en las muestras de masas tumorales desarrolladas en ratones desnudos. Los ratones fueron anestesiados del mismo modo con pentobarbital sódico (50mg/kg peso corporal) y perfundidos intracardiamente con solución salina (0.9% NaCl en H₂O, suplementado con 0.08% heparina al 5%) para retirar la sangre. Después se extrajeron las muestras por disección y fueron post-fijadas por inmersión un máximo de 4 horas a 4°C con solución fijadora de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1M, pH7.4.

Los cerebros de rata, una vez post-fijados, se cortaron en secciones coronales de 35µm de grosor mediante un vibratomo (Leica VT1000S, Wetzlar, Alemania), siendo recogidos de manera seriada en flotación libre (free-floating). De cada cerebro se recogieron 6 series de cortes. Las masas tumorales extraídas del flanco de los ratones desnudos, una vez postfijadas, fueron crioprotegidas mediante inmersión en solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato (0.1M, pH 7.4) y posteriormente incluidas en Tissue-Tek (Sakura, Zoeterwoude, Holanda) para ser congeladas a -20°C. Estos tejidos fueron cortados mediante un criostato (Leica CM1900, Wetzlar, Alemania), realizando secciones seriadas de 25µm, recogidas sobre portaobjetos con superficie gelatinizada.

Método general de marcaje inmunohistoquímico: inmunofluorescencia y revelado con DAB

El proceso inmunohistoquímico de detección de proteínas sobre tejido fue, de manera general, realizado sobre cortes histológicos en flotación libre y agitación continua, excepto para las muestras tumorales de ratones desnudos, que fueron inmunomarcadas sobre portaobjetos gelatinizados. Se emplearon dos tipos de marcaje: inmunohistoquímica simple (1 epítipo) revelada con DAB (diaminobenzidina) e inmunofluorescencia doble (2 epítipos), compartiendo ambas técnicas gran parte del proceso.

Anticuerpo	Casa comercial	Inmunocitoquímica	Inmunohistoquímica
Rabbit α -Phospho-Histone H3 (Ser10)	Upstate	1:250	1:500
Mouse α -GFAP	Chemicon	1:2000	----
Mouse α -Nestin	BD Biosciences	----	1:750
Mouse α -CD3	Santa Cruz Biotechnologies	----	1:300
Mouse α -CD68	Serotec	----	1:500
Rabbit α -Cleaved Caspase 3 (Asp175)	Cell Signaling	----	1:250
Mouse α -BrdU	DHB	----	1:2000
Goat α -rabbit IgG Alexa 488	Molecular Probes	1:1000	1:1000
Goat α -rabbit IgG Alexa 594	Molecular Probes	----	1:1000
Goat α -mouse IgG Alexa 488	Molecular Probes	----	1:1000
Goat α -mouse IgG Alexa 594	Molecular Probes	1:1000	1:1000
Goat α -mouse IgG Biot conj	Jackson Immunores.	----	1:250

Tabla 3. Anticuerpos empleados en inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. Relación de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en las técnicas de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica, así como su casa comercial y la dilución empleada para cada uno.

De este modo, las secciones fueron sucesivamente tratadas a temperatura ambiente con solución bloqueante de la peroxidasa endógena (metanol 1%/H₂O₂ 0.3% en PBS + 0.1%Tween20, PBST, 30min; paso omitido en inmunofluorescencia), y con solución bloqueante de uniones inespecíficas (5% de suero de cabra, 0.1% BSA, en PBST, 1 hora), realizando 6 lavados de 10 minutos con PBST entre los diferentes pasos. Posteriormente, se incubaron las secciones con el anticuerpo primario (Tabla 3), diluido en solución bloqueante,

durante 1-2 noches a 4°C. Seguidamente, y tras sucesivos lavados con PBST, se realizó una incubación con un anticuerpo secundario específico conjugado a biotina (Tabla 3; para la inmunohistoquímica simple) o una mezcla de anticuerpos secundarios específicos conjugados a fluorescencia (AlexaFluor, Tabla 3; para la inmunofluorescencia) en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad.

En el caso de la inmunohistoquímica simple, tras la incubación con el anticuerpo secundario biotinilado, se incubaron las secciones con el complejo de amplificación de señal avidina-biotina-peroxidasa Vectastain ABC (Vector Labs, Burlingame, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante, durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras sucesivos lavados con PBST, se visualizó la señal mediante una reacción de precipitación de la diaminobenzidina (0.03% DAB con 0.01% H₂O₂ en tampón fosfato 0.1M). Las secciones en flotación libre fueron montadas sobre portaobjetos gelatinizados, empleando posteriormente DePeX (BDH, Poole, Reino Unido) como solución de montaje.

Las secciones destinadas al método de inmunofluorescencia fueron marcadas con Hoechst (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU; 1:5000; 5 minutos en oscuridad) para permitir la visualización de los núcleos celulares, y montadas sobre portaobjetos gelatinizados empleando mowiol (La Jolla, EEUU) como solución de montaje.

Método específico de marcaje inmunohistoquímico de BrdU

El método inmunohistoquímico de detección de la incorporación de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato), en los tumores desarrollados en ratones desnudos, se llevó a cabo en cortes histológicos montados sobre portaobjetos. Dicho tejido se post-fijo específicamente un máximo de 4 horas. La tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo de manera similar al método general anteriormente explicado, precisando las siguientes modificaciones.

Previamente a la incubación con la solución bloqueante de la peroxidasa endógena, se trató el tejido con una solución permeabilizante de citrato sódico 10mM en ebullición, enfriándolo seguidamente en hielo durante 5 minutos. Se repitió la misma operación 3 veces, realizando después 5 lavados de 5 minutos con PBS. Posteriormente, se trató el tejido con una solución desnaturalizante de HCl 2N durante 30 minutos a 37°C, a fin de desenmascarar el antígeno, seguido de 5 lavados de 5 minutos con PBS. A continuación se siguió el procedimiento de la inmunohistoquímica simple con DAB, descrita en el apartado anterior, incubando con anti-BrdU como anticuerpo primario y con el anticuerpo secundario conjugado a biotina (Tabla 3).

7.3. Procesado de imágenes

Las secciones procedentes de la inmunohistoquímica simple con DAB fueron visualizadas mediante un microscopio Olympus Provis AX70 acoplado a un sistema de captura de imagen Olympus DP70.

La visualización de las secciones procedentes de la inmunofluorescencia y la inmunocitoquímica fue realizada mediante un microscopio Olympus Provis AX70 acoplado a

un sistema de captura de imagen Olympus DP70 y alternativamente mediante un sistema confocal Leica TCS-SP5, acoplado a un microscopio Leica DMI6000CS.

Una vez obtenidas, las imágenes se procesaron mediante el software de procesamiento digital Adobe Photoshop CS3 e Illustrator CS3 (Adobe Inc.).

7.4. Métodos de cuantificación y análisis

En el modelo de glioma intracraneal, el volumen del tumor fue medido en secciones de cerebro de los animales con gliomas de células C6 o de C6-GFP, detectando el tumor mediante inmunohistoquímica anti-nestina o fluorescencia de GFP, respectivamente. Las secciones de los diferentes grupos experimentales fueron procesadas en paralelo, con iguales tiempos de incubación y con iguales condiciones de adquisición de imagen. Las imágenes obtenidas con el objetivo 4X fueron cuantificadas con la ayuda del sistema de análisis AIS (Analytical Imaging Station; Imaging Research Inc., Linton, England). Se midió el área proporcional marcada con nestina o GFP (intensidad de marcaje/área tumoral) de cada sección, tanto en los animales control (tratados con PBS) como en los tratados con GD1b, O-Ac GD1b u O-But GD1b. De cada animal se midieron todas las secciones de una misma serie de cerebro, para así calcular el volumen tumoral total de cada animal como el Σ (área proporcional marcada x grosor de la sección (35 μ m)) x nº de series (6). Las mediciones fueron realizadas en 7 animales por grupo de estudio. Los resultados se expresaron como volumen tumoral relativo al control del experimento (tratamiento con PBS).

La cuantificación del número de células pHH3 y Caspasa-3 positivas en los gliomas intraestriatales de rata se realizó en 4 secciones por animal y siete animales por grupo de estudio (Control, O-Ac GD1b y O-But GD1b), en las zonas con tumor marcado con GFP o nestina. En cada sección, las células marcadas fueron contadas en tres campos diferentes de imágenes adquiridas con el objetivo de 20X. Los resultados se expresaron como porcentaje células pHH3 positivas respecto al control de PBS y número de células caspasa-3 positivas por área de tumor.

La cuantificación del número de macrófagos y células T (CD68+ y CD3+, respectivamente) fue realizada en 3 campos diferentes de imágenes adquiridas con el objetivo de 10X, en 4 secciones de cerebro con tumor por animal, en 7 animales por grupo. El tumor se identificó con el marcaje con GFP o nestina y se midió el área tumoral de cada campo con el software Image J (ImageJ 1.38x (Rasband, 2008)). Los resultados se expresaron como número de células marcadas por área de tumor.

En el caso de los tumores implantados en los ratones desnudos, previamente inyectados con BrdU, se cuantificó el número de células BrdU positivas en 3 campos de imágenes 40X en diez cortes al azar por cada tumor de cada grupo (n=6). El área tumoral se midió con el software Image J (ImageJ 1.38x (Rasband, 2008)), y los resultados se expresaron como número de células marcadas por área de tumor.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete estadístico Statistica 6.0 (StatSoft Inc.). En todos los casos, excepto en el análisis de los datos de la expresión génica por arrays de PCR, se aplicó un ANOVA de una vía para analizar las diferencias entre los tratamientos, ya que se cumplían los supuestos de normalidad y homocedasticidad. El análisis de los datos de expresión génica se realizó mediante el software de SA Biosciences, utilizando un test-T. En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue <0.05 .

En los ensayos de inhibición de la proliferación de las líneas celulares U373MG y C6 se empleó un ajuste a una regresión logarítmica, presentando los valores de R^2 (ajuste a la tendencia) e ID_{50} (concentración que produce la inhibición del 50% de las células). El crecimiento de los xenotransplantes en ratones desnudos fue ajustado a una regresión lineal, con el fin de evaluar la velocidad de crecimiento, comparando las pendientes de las regresiones individuales mediante un ANOVA de una vía. En la cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford (aptdo. 6.1) se empleó un estándar por duplicado de concentraciones conocidas de BSA, relacionándolo con la absorbancia obtenida mediante una regresión lineal. La ecuación obtenida fue empleada para calcular la concentración de proteína de las muestras problema.

RESULTADOS

1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DERIVADOS GLICOLIPÍDICOS DE GD1b

1.1. Síntesis de derivados acetilados o butirilados de GD1b

1.1.1. Reacciones de O-sustitución de gangliósidos: antecedentes

El primer objetivo que se planteó en este trabajo fue la síntesis de neurostatina a partir de GD1b, introduciendo un grupo acetilo en el ácido siálico terminal. Anteriores trabajos demostraron que esta acetilación de GD1b es fundamental para la actividad anti-proliferativa de la neurostatina (Abad-Rodriguez y cols., 2000; Romero-Ramirez y Nieto-Sampedro, 2004), por lo que se quiso evaluar el efecto de la introducción de acetilaciones múltiples sobre la actividad inhibitoria del compuesto. Por otra parte, deseamos un derivado de la neurostatina en el que el grupo acetilo del ácido siálico externo fuera sustituido por un grupo butirilo, el cual posee una cadena carboxílica de mayor longitud. Complementariamente, y de igual modo que con el radical acetilo, se evaluó el efecto de la inserción de múltiples butirilaciones en la estructura de GD1b sobre la actividad anti-proliferativa del compuesto.

Basándonos en los datos previos descritos por Hubl *et al.*, 2000, al hacer reaccionar GD1b con trimetilortoacetato en presencia del catalizador p-toluenosulfónico, GD1b se 9-O-acetilaría preferentemente en el ácido siálico terminal (Fig. 8; R1), obteniéndose por tanto el gangliósido neurostatina. Las O-acetilaciones múltiples que pudieran ocurrir en la molécula, lo harían presumible y secuencialmente en el ácido siálico interno (Fig. 8; R2) y la cadena de azúcares (Fig. 8; R3 y R4). De igual manera, para obtener GD1b butirilado en el ácido siálico terminal se hizo reaccionar GD1b con trimetilortobutirato en presencia de p-toluensulfónico como catalizador, obteniendo GD1b mono-butirilado. Las siguientes O-butirilaciones que ocurran en la estructura se situarían preferentemente en el ácido siálico interno (Fig. 8; R2) y después en la cadena de azúcares (Fig. 8; R3 y R4).

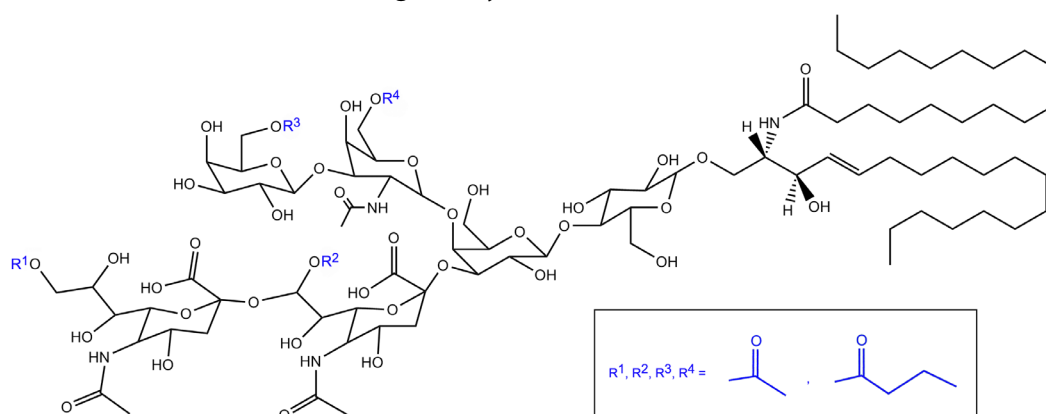


Figura 8. Posibles lugares de O-sustitución de GD1b.

Localización de los lugares de O-sustitución teóricos (R¹, R², R³, R⁴) en la molécula de GD1b. Los residuos pueden ser sustituidos con radicales acetilo (O-acetilación) o butirilo (O-butirilación), como se muestra en el cuadro situado en la parte inferior derecha (azul).

1.1.2. Condiciones generales de síntesis de derivados O-acetilados mono-sustituídos

La neurostatina fue descrita como el gangliósido GD1b O-acetilado en la posición 9 de su ácido siálico terminal (Abad-Rodriguez y cols., 2000). Al introducir un acetilo en la estructura de GD1b, la sustitución ocurre favorablemente en el ácido siálico terminal del gangliósido y, aunque haya varios lugares de sustitución posibles dentro del siálico (posiciones 7, 8 y 9), en estas condiciones de reacción y a pH fisiológico las O-acetilaciones se localizan en la posición 9. GD1b posee dos ácidos siálicos en su estructura, así que para conseguir neurostatina (especie mono-sustituída) y evitar múltiples acetilaciones, las condiciones de reacción deben de ser restrictivas. Para ello se llevaron a cabo reacciones de O-acetilación en diferentes condiciones, con el fin de definir las variables restrictivas por las cuales se limita a una sola sustitución.

Las condiciones de reacción que variamos fueron la concentración de sustituyente y el tiempo de reacción, manteniendo la temperatura de reacción constante a 18°C, basándonos en los datos descritos previamente por Hubl (Hubl y cols., 2000). Una vez llevadas a cabo las reacciones de O-acetilación en diferentes condiciones se desarrollaron cromatografías en capa fina para visualizar los productos de reacción y evaluar el resultado de las distintas condiciones ensayadas. Se evaluó el rendimiento de la reacción, considerado como el porcentaje de producto de reacción mono-sustituído (identificado por su migración en TLC) obtenido con respecto al total de productos de la síntesis, analizado mediante densitometrado de las bandas visualizadas en la cromatografía en capa fina (Tabla 4).

		Exceso Molar de TMOA	
		500	1000
Tiempo de Reacción (horas)	48	2%	4%
	24	7%	3%
	16	10%	—
	8	41%	—

Tabla 4. Eficiencia de la reacción de O-acetilación.

Reacción de O-acetilación de GD1b en diferentes condiciones de tiempo (horas) y exceso molar de trimetilortoacetato (TMOA). Se expresa el porcentaje de producto mono-O-acetilado obtenido, con respecto al total reaccionado. (-) No determinado.

El rendimiento de la síntesis de derivados mono-acetilados de GD1b experimentó un aumento cuando se redujo el exceso molar de trimetilortoacetato (TMOA) a 500 partes, en comparación con la condición inicial de 1000 partes, pasando de 3% a 7% el producto obtenido tras 24 horas de reacción (Tabla 4). Cuando se disminuyó el exceso molar de sustituyente a 250, resultó no ser suficiente para producirse la reacción de O-acetilación obteniéndose como único producto de reacción el GD1b inicial. En cuanto al tiempo de reacción, manteniendo constante la proporción de TMOA en 500 partes, se observó como la

disminución del tiempo desde 48 hasta 8 horas se tradujo en un aumento progresivo del rendimiento de la reacción, alcanzando un valor de rendimiento del 41% (Tabla 4). Tiempos de reacción más cortos no mejoraron el rendimiento. Así se definieron las condiciones óptimas de reacción de O-acetilación para la obtención del gangliósido GD1b mono-sustituído como 500 de exceso molar de TMOA y 8 horas de reacción a 18°C de temperatura.

1.1.3. Aislamiento de compuestos obtenidos mediante O-acetilación química de GD1b

Una vez definidas las condiciones de reacción de O-acetilación como 500 de exceso molar de TMOA y 8 horas de tiempo de reacción, se llevaron a cabo reacciones de síntesis para la obtención de la especie mono-sustituída, y se introdujeron variaciones en la temperatura de 18 a 25°C, con el fin de obtener compuestos con diferente número de sustituciones y evaluar el cambio en la actividad del compuesto.

El producto de la reacción desarrollada a 18°C de temperatura, una vez desalado, mostró dos bandas diferenciadas en TLC (Fig. 9A). Si comparamos las dos bandas con los patrones (de menor a mayor movilidad: GD1b y GD1a), observamos que la banda más próxima a la zona de aplicación de la muestra, correspondió con GD1b sin reaccionar. Según la literatura, la neurostatina se caracteriza por una movilidad en TLC mayor que GD1b y menor que GD1a (Abad-Rodriguez y cols., 2000). Esto corresponde a la movilidad de la segunda banda que se observó en la TLC (Fig. 9A). Luego la segunda banda podría corresponder a GD1b una vez acetilado. El compuesto correspondiente a esa banda fue nombrado como compuesto **2** hasta su completa caracterización. La acetilación aumentó la movilidad de GD1b disminuyendo su polaridad, siendo el R_f de GD1b $0,195 \pm 0,019$ y el del compuesto **2** $0,284 \pm 0,014$ (Tabla 5), coincidiendo con la movilidad que presenta la especie mono-sustituída 9-O-Ac GD1b o neurostatina.

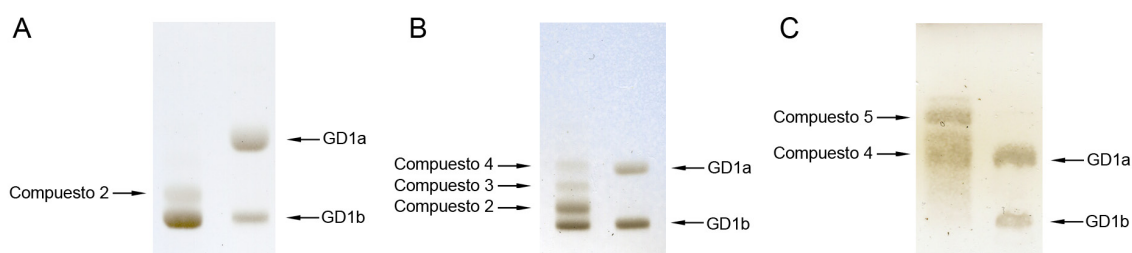


Figura 9. Migración en TLC de los productos de reacción de la O-acetilación química de GD1b. Cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de reacción obtenidos de la O-acetilación química de GD1b a 18°C (**A**; izquierda), 21°C (**B**; izquierda) y 25°C (**C**; izquierda), y del patrón de gangliósidos (GD1a y GD1b; **A**, **B** y **C** derecha). A medida que aumenta el número de sustituciones disminuye la polaridad de los derivados de GD1b (compuestos **2-5**).

Al aumentar la temperatura de reacción a 21°C se obtuvieron diferentes productos de reacción con una mayor movilidad en TLC que la especie monosustituída (Fig. 9B). La

primera banda, empezando desde el punto de aplicación, coincidió con el patrón de GD1b y la siguiente banda coincidió con la del compuesto **2** (Fig. 9B). De manera adicional, aparecieron dos bandas con mayor movilidad en TLC, lo que indicó la generación de compuestos más apolares y que corresponderían a especies de GD1b con mayor número de acetilaciones (Fig. 9B). El compuesto correspondiente a la banda con movilidad mayor que el compuesto **2**, definido con un R_f de $0,329 \pm 0,024$ (Tabla 5), fue nombrado como compuesto **3** y el siguiente en movilidad con un R_f en TLC de $0,479 \pm 0,073$ (Tabla 5) fue llamado compuesto **4**.

Compuesto	R_f
1	$0,195 \pm 0,019$
2	$0,284 \pm 0,014$
3	$0,329 \pm 0,024$
4	$0,479 \pm 0,073$
5	$0,623 \pm 0,083$
6	$0,357 \pm 0,052$
7	$0,427 \pm 0,072$
8	$0,688 \pm 0,079$
9	$0,793 \pm 0,099$

Tabla 5. Migración en TLC de los compuestos 1-9.

Factor de retención (R_f) de GD1b (**1**) y de los compuestos derivados de GD1b (**2-9**) en cromatografía en capa fina (TLC), expresado como media \pm SD.

Al llevar a cabo la reacción a mayor temperatura (25°C) aparecieron dos productos de reacción con movilidad en TLC muy elevada (Fig. 9C). Se observó la ausencia de la banda correspondiente a GD1b, lo que indicaba una total reacción del compuesto de partida, acetilándose éste varias veces ya que el R_f de las bandas obtenidas supera el de los compuestos **2** y **3** (Tabla 5). La primera banda desde el punto de aplicación coincidió con el R_f del compuesto **4** (Fig. 9C). La siguiente banda con mayor movilidad ($R_f = 0,623 \pm 0,083$), y por tanto más apolar que los productos de reacción anteriores, se identificó como un derivado varias veces O-acetilado de GD1b que fue llamado compuesto **5** (Fig. 9C). Estos datos apoyaron la idea de que la O-sustitución química depende del tiempo de reacción, el exceso molar de sustituyente y de la temperatura. Cuando no son mantenidas las condiciones descritas anteriormente, la reacción se desplazó y aparecieron múltiples acetilaciones en la estructura de GD1b.

Los cuatro productos de reacción obtenidos por O-acetilación química fueron nombrados como **2**, **3**, **4**, y **5** (Fig. 9A, 9B, 9C) y definidos por su R_f (Tabla 5) hasta su caracterización. El compuesto **2** presentaba características en TLC similares a la especie de GD1b mono-sustituída (neurostatina), y los compuestos **3**, **4** y **5** correspondieron a derivados de GD1b con apolaridad creciente, indicando la creciente presencia de O-acetilaciones en su estructura.

1.1.4. Aislamiento de compuestos obtenidos mediante O-butilación química de GD1b

Del mismo modo que para la reacción de O-acetilación, se llevaron a cabo reacciones de O-butililación en las mismas condiciones: 500 de exceso molar de trimetilortobutirato (TMOB), 8 horas de reacción y variaciones en la temperatura de 18 a 25°C, con el fin de obtener compuestos con diferente número de butirilaciones.

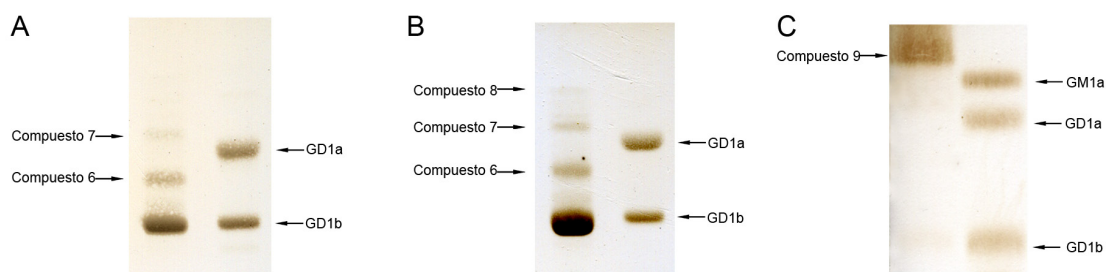


Figura 10. Migración en TLC de los productos de reacción de la O-butililación química de GD1b. Cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de reacción obtenidos de la O-butililación química de GD1b a 18°C (**A**; izquierda), 21°C (**B**; izquierda) y 25°C (**C**; izquierda), y del patrón de gangliósidos (GD1a y GD1b; **A**, **B** y **C** derecha). A medida que aumenta el número de sustituciones disminuye la polaridad de los derivados de GD1b (compuestos **6-9**).

Observamos en TLC tres productos de reacción a 18°C (Fig. 10A). La banda más cercana al punto de aplicación correspondió al gangliósido GD1b sin reaccionar. La siguiente banda presentó una movilidad en TLC intermedia entre GD1b y GD1a, indicando una menor polaridad que GD1b y apuntando a una exitosa O-butililación. El compuesto correspondiente con esta banda fue nombrado como **6**, definido por un R_f de $0,357 \pm 0,052$ (Tabla 5). La última banda que aparece en la TLC, correspondió a un compuesto más apolar y por consiguiente con mayor número de O-butililaciones que el anterior (Fig. 10A). Fue nombrado como compuesto **7**, con R_f de $0,427 \pm 0,072$ (Tabla 5). Al aumentar la temperatura de reacción hasta 21°C (Fig. 10B) apareció un producto de reacción adicional a la reacción anterior (18°C). El compuesto correspondiente a esta banda fue nombrado como compuesto **8** y presentó mayor movilidad en TLC y mayor número de O-butililaciones que el compuesto **7** (Fig. 10B). Aumentando la temperatura de reacción a 25°C observamos que solo aparece un producto de reacción muy apolar (Fig. 10C). No se observó la banda de GD1b, indicando que había reaccionado en su totalidad, produciéndose múltiples O-butililaciones en su estructura, ya que es el producto que presentó mayor R_f ($0,793 \pm 0,099$; Tabla 5) y menor polaridad en comparación con los compuestos **6**, **7** y **8**.

Los cuatro productos de reacción obtenidos por O-butililación química, nombrados como **6**, **7**, **8** y **9** (Fig. 10A, 10B, 10C), y definidos por su R_f (Tabla 5) hasta su caracterización, presentan una polaridad decreciente, directamente proporcional al número de sustituciones de su estructura.

1.2. Caracterización de los derivados O-sustituídos de GD1b

1.2.1. Caracterización de los derivados O-acetilados de GD1b (Compuestos 2, 3, 4 y 5)

Los compuestos semi-sintéticos obtenidos mediante O-acetilación de GD1b fueron purificados por TLC, extraídos, desalados y cuantificados para después ser caracterizados por MALDI-TOF (Tabla 6) y Electrospray-Ms (Fig. 11). Estos métodos nos permitieron por una parte identificar el peso molecular de los compuestos sintetizados y correlacionarlo con su estructura (número de O-sustituciones), y por otra parte conocer la localización de los sitios de O-sustitución dentro de la estructura del compuesto.

Determinación del número de O-acetilaciones en la estructura de los compuestos 2, 3, 4 y 5

Los espectros de MALDI-TOF (Tabla 6) fueron analizados teniendo en consideración las diferentes especies de GD1b presentes en la muestra (ceramida (18:1) ó (20:1)) y la formación o no del aducto sódico (M-H o M+Na-H). Al peso de estas especies se le añade el de los sustituyentes, en este caso diferente número de grupos acetilo ($m/z=43$), para calcular los pesos moleculares de los nuevos compuestos (Tabla S1). El análisis del espectro de MALDI-TOF correspondiente al compuesto **2** (Tabla 6) mostró varios picos de pesos moleculares (m/z) correspondientes a las mismas especies que GD1b pero una vez O-acetiladas por lo que los pesos se vieron incrementados en 43 unidades. Los picos 1878.23 y 1905.25 pertenecieron a las especies con esfingosinas (18:1) y (20:1) de GD1b una vez O-acetiladas, respectivamente. De igual modo los picos 1900.22 y 1928.26 correspondieron a los aductos sódicos de las especies de GD1b con esfingosinas (18:1) y (20:1) una vez O-acetiladas, respectivamente.

COMPUESTO	PICOS DE MALDI-TOF (m/z)	
	M-H	M+Na-H
1. GD1b	1835.88 (18:1) 1863.91 (20:1)	1859.32 (18:1) 1885.88 (20:1)
2. O-AcGD1b	1878.23 (18:1) 1905.25 (20:1)	1900.22 (18:1) 1928.26 (20:1)
3. Bi-O-AcGD1b	1922.13 (18:1) 1950.15 (20:1)	1972.12 (20:1)
4. Tri-O-AcGD1b	1964.12 (18:1) 1992.15 (20:1)	1986.02 (18:1) 2014.12 (20:1)
5. Tetra-O-AcGD1b	2006.05 (18:1)	2030.02 (18:1) 2056.05 (20:1)

Tabla 6. Análisis por MALDI-TOF de los compuestos O-acetilados 2-5.

Picos de m/z obtenidos en el análisis por MALDI-TOF de los compuestos **1-5**. Se presentan los datos correspondientes a los compuestos derivados de GD1b con ceramidas 18:1 y 20:1, y a las especies M-H y M+Na-H (aducto sódico).

Analizando de similar manera los espectros del resto de compuestos, los picos que aparecieron en el espectro del compuesto **3** correspondieron a las especies de GD1b con las ceramidas (18:1) y (20:1) y al aducto sódico de la primera, con dos O-acetilaciones. En el análisis del espectro de masas del compuesto **4**, que presentaba mayor movilidad en TLC que el anterior, y por tanto es un compuesto más polar, identificamos los picos correspondientes a las cuatro especies de GD1b, tres veces acetiladas. Finalmente el análisis por MALDI-TOF del compuesto **5** mostró la presencia de los picos m/z correspondientes a GD1b con ceramida (18:1) cuatro veces O-acetilado, y los aductos sódicos de las especies con ceramidas (18:1) y (20:1), con cuatro O-acetilaciones (Tabla 6).

Estos resultados nos permitieron conocer el número de O-acetilaciones que presentó cada compuesto sintetizado y nombrar los compuestos obtenidos mediante O-acetilación química de GD1b como, O-Ac GD1b al compuesto **2**, Bi-O-Ac GD1b al compuesto **3**, Tri-O-Ac GD1b al compuesto **4** y finalmente Tetra-O-Ac GD1b al compuesto **5** (Tabla 6), según hipotetizamos anteriormente.

Determinación de la posición de las O-acetilaciones en la estructura de los compuestos 2, 3, 4 y 5

Una vez descrito el número de O-acetilaciones que tienen los compuestos **2, 3, 4 y 5**, analizamos los espectros obtenidos con la técnica de electrospray-MS (Fig. 11), con el fin de conocer la localización de las O-acetilaciones descritas en el MALDI-TOF. Con la técnica de electrospray se fragmentó la molécula de interés y se hizo el seguimiento de los fragmentos para poder identificar en cual de ellos se encuentra el grupo acetilo y por tanto definir la estructura completa del compuesto. Tomamos como referencia la estructura de GD1b ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 [\text{Neu5Ac}\alpha 2 \rightarrow 8 \text{Neu5Ac}\alpha 2 \rightarrow 3] \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1' \text{-ceramida}$). El análisis del compuesto **2** por electrospray-MS (Fig. 11A) muestra que la O-acetilación que contiene en su estructura esta localizada en el ácido siálico externo de GD1b como evidencia la fragmentación del compuesto. Se obtuvieron fragmentos correspondientes a un ácido siálico unido a un grupo acetilo (O-Ac-Neu5Ac α ; $m/z=332.16$), y dos ácidos siálicos unidos a un solo grupo acetilo (O-Ac-Neu5Ac $\alpha 2 \rightarrow 8$ Neu5Ac α ; $m/z=623.28$). Consecuentemente, cuando los ácidos siálicos fueron fragmentados se obtuvieron dos picos correspondientes al resto de la estructura sin acetilar: $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 [\text{Neu5Ac}\alpha 2 \rightarrow 3] \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1' \text{-ceramida}$ ($m/z=1545.84$) y $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1' \text{-ceramida}$ ($m/z=1254.72$).

De igual modo, cuando se analizó el espectro del compuesto **3** ($m/z=960.08$; Fig. 11B), se encontraron dos acetilaciones. Uno de los grupos acetilo fue localizado en el ácido siálico terminal ($m/z=332.16$) igual que en el compuesto **2**, y el segundo de los grupos acetilos fue localizado en el ácido siálico interno, como indicó la presencia del pico 1587.92 correspondiente a dos ácidos siálicos acetilados (O-Ac-Neu5Ac $\alpha 2 \rightarrow 8$ O-Ac-Neu5Ac α), y el pico 665.28 correspondiente a la estructura con un solo ácido siálico y una sola acetilación (O-Ac ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 4 [\text{O-AcNeu5Ac}\alpha 2 \rightarrow 3] \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}\beta 1 \rightarrow 1' \text{-ceramida}$)).

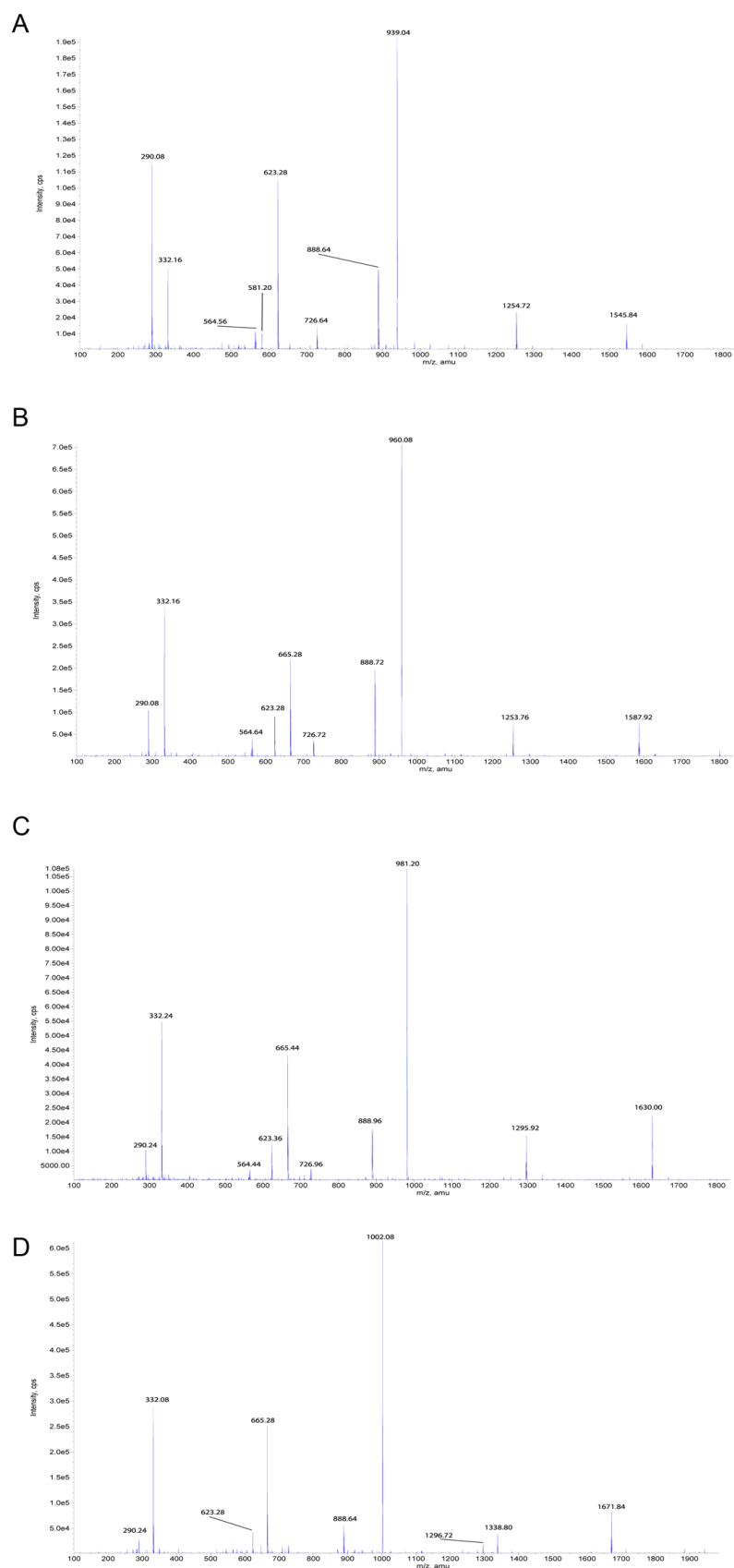


Figura 11. Caracterización mediante Electrospray-MS de los compuestos acetilados (2-5).

(A-D) Espectros correspondientes a la caracterización por Electrospray-MS de los compuestos 2-5, respectivamente. Todos los espectros fueron obtenidos a partir del fraccionamiento de compuestos derivados de la especie 18:1 de GD1b. Los valores m/z de cada pico se indican en la parte superior del mismo.

El análisis del compuesto **4** ($m/z=981.20$; Fig. 11C), con tres acetilaciones en su estructura, indicó que tanto el ácido siálico interno como el externo estaban acetilados ($m/z=332.24$, $m/z=665.44$ y $m/z=1630$), localizándose la tercera acetilación en la cadena de azúcares, como evidenciaron los picos correspondientes a la cadena de azúcares con una acetilación ($m/z=1295.92$; O-Ac (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4 Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida)) y a la molécula sin un ácido siálico y con dos acetilaciones ($m/z=1630.00$; O-Ac (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4 [O-AcNeu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida)).

Finalmente, el análisis del espectro del compuesto **5** (Fig 11D), con cuatro O-acetilaciones ($m/z=1002.08$), mostró que los dos ácidos siálicos de GD1b estaban acetilados ($m/z=332.08$, $m/z=665.28$, $m/z=1338.80$ y 1671.84) y que los otros dos grupos acetilo estaban en la cadena de azúcares, como evidenció la presencia de Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida con una acetilación ($m/z=1296.72$), Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida con dos acetilaciones ($m/z=1338.80$) y Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-AcNeu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida con dos acetilaciones ($m/z=1671.84$).

Teniendo en consideración los resultados obtenidos por MALDI-TOF y Electrospray-MS, propusimos la siguiente dinámica de sustitución en la reacción de O-acetilación de GD1b bajo las condiciones de reacción anteriormente descritas: la primera O-acetilación se produce en el siálico externo o terminal de GD1b, como ya se había hipotetizado en el apartado 1.1.1., ya que esa sustitución esta favorecida. La segunda O-acetilación se produce en el ácido siálico interno de GD1b. La tercera y cuarta O-acetilaciones ocurren en los grupos hidroxilo de los azucars más externos del gangliósido (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β), lo cual se evidencia por la presencia de Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida sin O-acetilaciones ($m/z=888.96$)

Gangliósido		Secuencia de Carbohidratos
1	GD1b	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida
2	O-AcGD1b	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida
3	Bi-O-AcGD1b	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida
4	Tri-O-AcGD1b	O-Ac-Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida
5	Tetra-O-AcGD1b	O-Ac-Gal β 1 \rightarrow 3O-Ac-GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida

Tabla 7. Compuestos obtenidos mediante O-acetilación química de GD1b.

Nomenclatura y secuencia de carbohidratos de los gangliósidos O-acetilados derivados de GD1b (**2-5**). Gal=D-galactosa; Glc=D-glucosa; GalNAc=D-galactosamina; Neu5Ac=ácido N-acetylneuraminico.

en los espectros de los compuestos **4** y **5** (Fig. 11C y 11D), y la ausencia de ácidos siálicos con más de una acetilación. En base a estos resultados y tal y como se indica en la Tabla 7, se describió el compuesto **2** ó O-Ac GD1b como Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4 [O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida o neurostatina, el compuesto **3** ó Bi-O-Ac GD1b como Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4 [O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida, el compuesto **4** ó Tri-O-Ac GD1b como O-Ac-Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4 [O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida y el compuesto **5** ó Tetra-O-Ac GD1b como O-Ac-Gal β 1 \rightarrow 3O-Ac-GalNAc β 1 \rightarrow 4 [O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida.

1.2.2. Caracterización de los derivados O-butilados de GD1b (Compuestos 6, 7, 8,y 9)

Los compuestos semi-sintéticos obtenidos mediante O-butilación de GD1b fueron purificados por TLC, extraídos, desalados y cuantificados para poder ser caracterizados por MALDI-TOF (Tabla 8) y Electrospray-Ms (Fig. 12). Estos métodos nos permitieron, por una parte, identificar el peso molecular de los compuestos sintetizados y correlacionarlo con su estructura (número de O-sustituciones), y por otra parte conocer la localización de las O-butilaciones dentro de la estructura del compuesto.

Determinación del número de O-acetilaciones en la estructura de los compuestos 6, 7, 8 y 9

Los espectros de MALDI-TOF (Tabla 8) fueron analizados del mismo modo que para los compuestos O-acetilados, descrito en el apartado anterior, teniendo en consideración las cuatro diferentes especies de GD1b debido a sus posibilidades de ceramida ((18:1) ó (20:1)) y la formación o no del aducto sódico (M-H o M+Na-H). Al peso de estas especies se le sumó el de los sustituyentes, en este caso diferente número de grupos butirilo ($m/z=70$), para conocer el peso molecular de los nuevos compuestos sintetizados (Tabla S1). El espectro de masas del compuesto **6** mostró diferentes picos con peso molecular (m/z) correspondiente a GD1b una vez butirilado, con diferentes ceramidas (Tabla 8). El pico de $m/z=1934.28$ correspondió a la especie con esfingosina (20:1) y los picos de 1929.37 y 1956.23 correspondieron a los aductos sódicos de las especies con esfingosinas (18:1) y (20:1), respectivamente. El espectro del compuesto **7** mostró picos de m/z correspondientes a las mismas especies que el compuesto **6** pero con dos O-butilaciones en su estructura (Tabla 8), incrementándose por tanto m/z en 70 unidades. El compuesto **8**, que presentaba mayor movilidad en TLC que el anterior, y por tanto menor polaridad, mostró un espectro de masas en el que aparecieron tres especies de GD1b (Tabla 8), la especie con esfingosina (20:1) y los aductos sódicos de las especies con esfingosinas (18:1) y (20:1), con tres O-acetilos en su estructura. Finalmente, el espectro del compuesto **9** presento cuatro picos (2116.26, 2144.27,

2138.21 y 2166.25) correspondientes a las 4 especies de GD1b cuatro veces O-acetiladas (Tabla 8).

Estos resultados nos permitieron conocer el número de O-butilaciones de los compuestos sintetizados mediante O-butilación química y nombrarlos como, O-But GD1b al compuesto **6**, Bi-O-but GD1b al compuesto **7**, Tri-O-But GD1b al compuesto **8** y finalmente Tetra-O-But GD1b al compuesto **9** (Tabla 8).

COMPUESTO	PICOS DE MALDI-TOF (m/z)	
	M-H	M+Na-H
1. GD1b	1835.88 (18:1) 1863.91 (20:1)	1859.32 (18:1) 1885.88 (20:1)
6. O-ButGD1b	1934.28 (20:1)	1929.37 (18:1) 1956.23 (20:1)
7. Bi-O-ButGD1b	1977.12 (18:1)	2000.21 (18:1) 2028.34 (20:1)
8. Tri-O-ButGD1b	2075.21 (20:1)	2068.15 (18:1) 2098.24 (20:1)
9. Tetra-O-ButGD1b	2116.26 (18:1) 2144.27 (20:1)	2138.21 (18:1) 2166.25 (20:1)

Tabla 8. Análisis por MALDI-TOF de los compuestos O-butilados 6-9.

Picos de m/z obtenidos en el análisis por MALDI-TOF de los compuestos **1, 6-9**. Se presentan los datos correspondientes a los compuestos derivados de GD1b con ceramidas 18:1 y 20:1, y a las especies M-H y M+Na-H (aducto sódico).

Determinación de la posición de las O-butilaciones en la estructura de los compuestos 6, 7, 8 y 9

Una vez descrito el número de O-butilaciones que tienen los compuestos **6,7,8 y 9**, analizamos los espectros obtenidos mediante electrospray-MS (Fig. 12) para determinar la localización de las O-butilaciones descritas mediante MALDI-TOF. Con la técnica de electrospray se fragmentó la molécula de interés, y se hizo el seguimiento de los fragmentos para identificar la localización de los grupos butirilo, y por tanto definir la estructura completa del compuesto. Se tomó como referencia la estructura de GD1b (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4 [Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida), siguiendo la misma lógica que en el análisis de los compuestos O-acetilados. El análisis del compuesto **6** (Fig. 12A) indicó que la butirilación se localizó en el ácido siálico externo de GD1b, ya que la sustitución se perdía cuando el ácido siálico externo era fragmentado (m/z=1544.80; Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[Neu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida). En consecuencia, se obtuvo un fragmento de un ácido siálico unido a un grupo butirilo (m/z=360.16; O-But-Neu5Ac α), y otro fragmento correspondiente a dos ácidos siálicos (m/z=651.28; O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α).

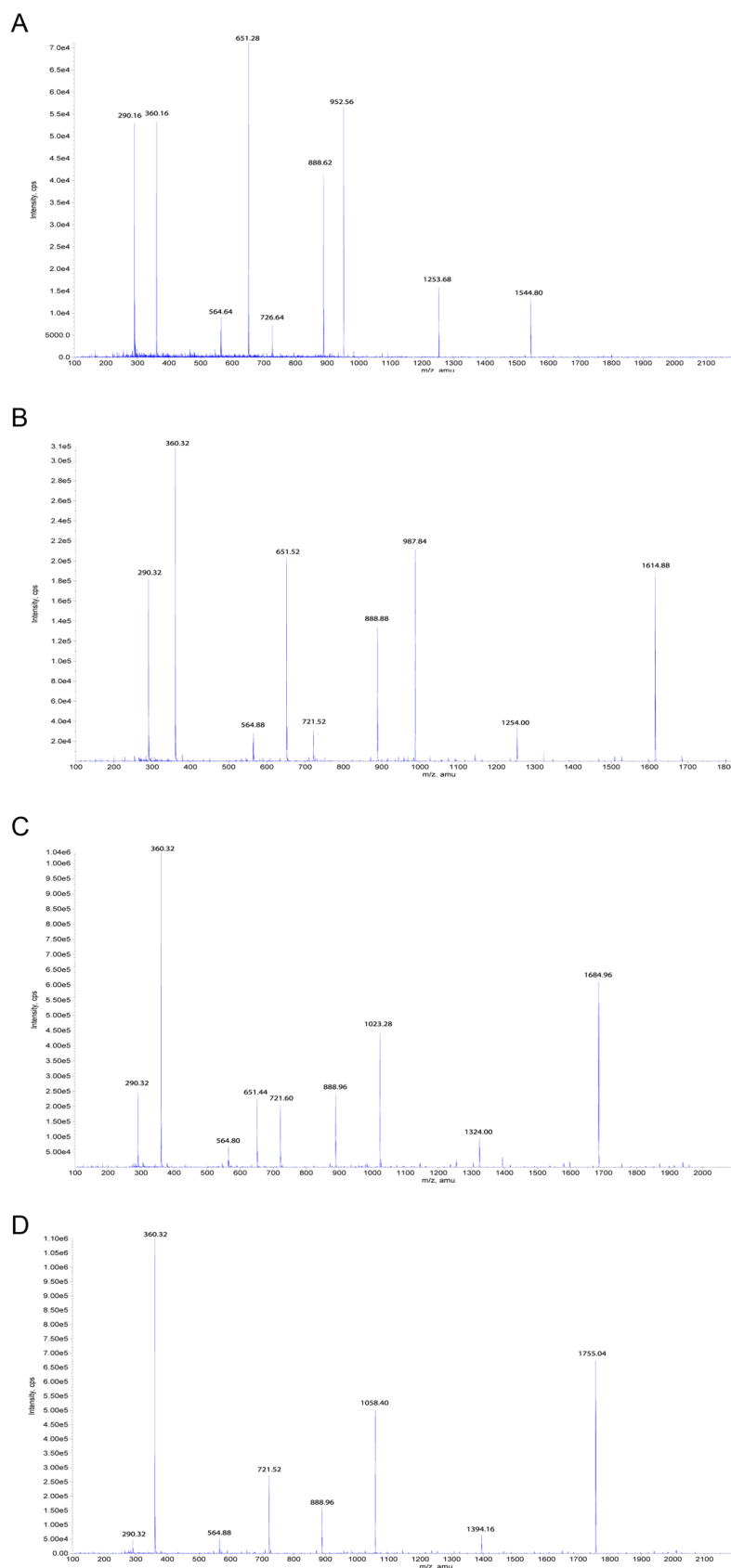


Figura 12. Caracterización mediante Electrospray-MS de los compuestos butirilados (6-9). (A-D) Espectros correspondientes a la caracterización por Electrospray-MS de los compuestos **6-9**, respectivamente. Todos los espectros fueron obtenidos a partir del fraccionamiento de compuestos derivados de la especie 18:1 de GD1b. Los valores m/z de cada pico se indican en la parte superior del mismo.

El espectro del compuesto **7** ($m/z=987.84$), que presentaba dos O-butilaciones en su estructura (Fig. 12B), mostró que uno de los grupos butirilos se localizaba en el ácido siálico terminal, evidenciado por la presencia de los fragmentos $m/z=360.32$, $m/z=651.52$ y $m/z=1614.88$ (O-But (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4 [Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida)). La presencia de este último fragmento junto con la del fragmento correspondiente a la cadena de azúcares sin butirilaciones $m/z=1254.00$ (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida) demostró que el segundo sustituyente se localizaba en el ácido siálico interno.

De manera similar al compuesto acetilado **4**, el compuesto **8** ($m/z=1023.28$) presentó dos de sus tres butirilaciones en los ácidos siálicos (Fig. 12C), como indica la presencia de los fragmentos correspondientes a O-But (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4 [O-ButNeu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida) ($m/z=1684.96$), O-But (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida) ($m/z=1324.00$), O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8O-But-Neu5Ac α ($m/z=721.60$) y O-But-Neu5Ac α ($m/z=360.32$). La tercera sustitución se localizó en la cadena de azúcares, evidenciado por la aparición de los picos de m/z 1324.00 y 651.44, correspondientes a O-But (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida) y O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α respectivamente, y a la presencia del pico correspondiente a Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida no acetilado ($m/z=888.96$).

Finalmente, el compuesto **9** (Fig. 12D; $m/z=1058$) presentó dos picos correspondientes con Bi-O-But (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4 [O-ButNeu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida) ($m/z=1755.04$) y O-But-Neu5Ac α ($m/z=360.32$), indicando que una de las butirilaciones estaba en el ácido siálico terminal. Otra O-butilación se localizó en el ácido siálico interno de GD1b, como demostraron los picos correspondientes a Bi-O-But (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida) ($m/z=1394.16$) y O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8O-But-Neu5Ac α ($m/z=721.52$), y dos O-butilaciones en la cadena de azúcares Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β , evidenciado por los fragmentos $m/z=888.96$ y $m/z=1394.16$.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por MALDI-TOF y Electrospray-MS, se propuso la misma dinámica de sustitución en la reacción de O-butilación de GD1b que la propuesta para la reacción de O-acetilación, bajo las condiciones de reacción anteriormente descritas. La primera O-acetilación ocurre favorablemente en el siálico externo, al igual que en la O-acetilación. La segunda O-butilación se produce en el ácido siálico interno. La tercera y cuarta O-butilaciones ocurren en los grupos hidroxilo de los azúcares más externos del gangliósido (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β), lo que se evidenció por la presencia de Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida sin O-butilaciones ($m/z=888.96$) en los espectros de los compuestos tres y cuatro veces O-butilados (Fig. 12C, 12D), y la ausencia de ácidos siálicos con más de una butirilación. En base a esta dinámica y tal y como se describe en la Tabla 9, describimos el compuesto **6** ó O-But GD1b como Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida (Tabla toc), el compuesto **7** ó Bi-O-But GD1b como Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida, el compuesto **8** ó Tri-O-But GD1b como O-But-Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-

ceramida y el compuesto **9** ó Tetra-O-But GD1b como O-But-Gal β 1 \rightarrow 3O-But-GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida.

Gangliósido		Secuencia de Carbohidratos
1	GD1b	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida
6	O-ButGD1b	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida
7	Bi-O-ButGD1b	O-But-Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida
8	Tri-O-ButGD1b	O-But-Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida
9	Tetra-O-ButGD1b	O-But-Gal β 1 \rightarrow 3O-But-GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramida

Tabla 9. Compuestos obtenidos por O-butilación química de GD1b.

Nomenclatura y secuencia de carbohidratos de los gangliósidos O-acetilados derivados de GD1b (**6-9**). Gal=D-galactosa; Glc=D-glucosa; GalNAc=D-galactosamina; Neu5Ac=ácido N-acetylneuraminico.

1.3. Condiciones de reacción de O-sustitución química específicas de cada compuesto.

Una vez caracterizados los derivados de GD1b sintetizados por O-acetilación y O-butilación química, y conociendo las estructuras de todos los compuestos obtenidos, se pudieron definir las condiciones de reacción específicas para la obtención de los ocho compuestos sintetizados, siete de ellos nuevos, cómo se indica en las Figuras 13 y 14.

Las O-sustituciones se localizaron en la posición 9 de los ácidos siálicos ya que esta reacción es regioselectiva para el carbono 9 del ácido siálico (Ogura y cols., 1987) y, aunque la sustitución también puede producirse en las posiciones 7 y 8, a pH fisiológico el sustituyente migra a la posición 9 (Kamerling y cols., 1987).

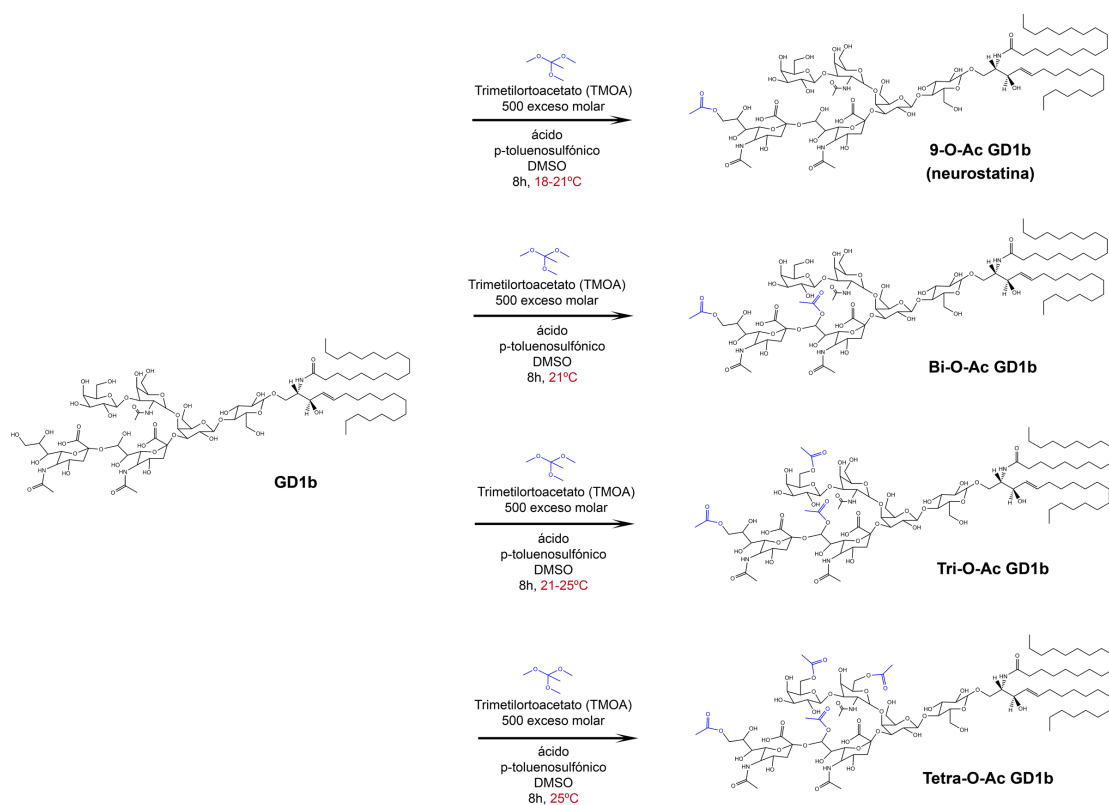


Figura 13. Condiciones de reacción de O-acetilación química de GD1b para la obtención de los compuestos 2, 3, 4 y 5.

Condiciones de reacción específicas de O-acetilación de GD1b que conducen a la obtención de los compuestos **2** (9-O-Ac GD1b o neurostatina), **3** (Bi-O-Ac GD1b), **4** (Tri-O-Ac GD1b) y **5** (Tetra-O-Ac GD1b). En cada caso, se indica la temperatura de reacción y la posición de los correspondientes grupos acetilo (azul) en la estructura del compuesto.

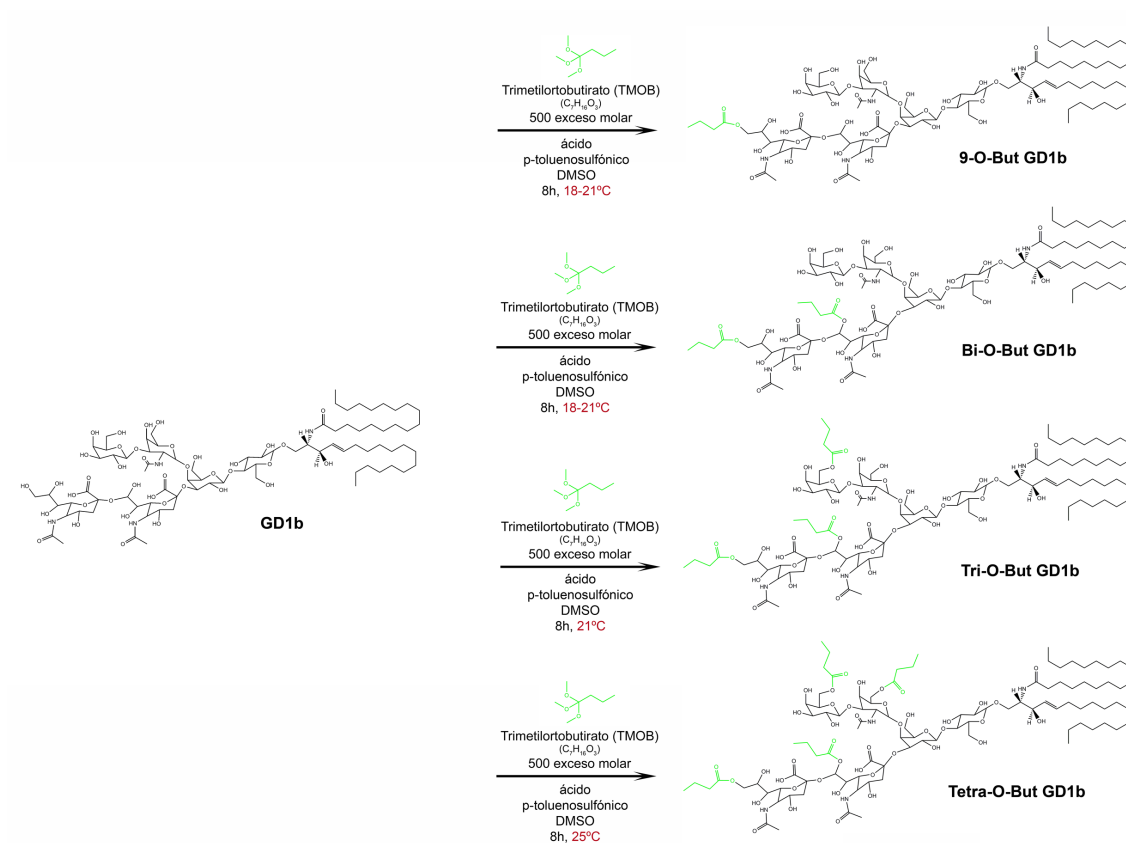


Figura 14. Condiciones de reacción de O-butyrlación química de GD1b para la obtención de los compuestos 6, 7, 8 y 9.

Condiciones de reacción específicas de O-butyrlación de GD1b que conducen a la obtención de los compuestos **6** (9-O-But GD1b), **7** (Bi-O-But GD1b), **8** (Tri-O-But GD1b) y **9** (Tetra-O-But GD1b). En cada caso, se indica la temperatura de reacción y la posición de los correspondientes grupos butirilo (verde) en la estructura del compuesto.

2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TUMORAL DE LOS GANGLIÓSIDOS SEMI-SINTÉTICOS DERIVADOS DE LA NEUROSTATINA

2.1. Actividad anti-tumoral *in vitro*

2.1.1. Actividad anti-tumoral de los derivados semi-sintéticos de la neurostatina

La neurostatina presenta una elevada actividad inhibitoria de la proliferación celular, tanto en cultivos primarios de astroblastos (Abad-Rodriguez y cols., 2000), como de la línea celular de astrocitoma humano U373MG (Romero-Ramirez y Nieto-Sampedro, 2004), con una ID_{50} de $1,8 \pm 0,1 \mu M$. Para comprobar si la actividad anti-proliferativa de O-Ac GD1b acetilado químicamente (compuesto **2**) correspondía a la de la neurostatina natural, y si los derivados de la neurostatina sintetizados (compuestos **3**, **4** y **5**) aumentaban dicha actividad, llevamos a cabo ensayos de inhibición de la proliferación de la línea de astrocitoma humano U373MG y de la línea de glioma de rata C6, evaluada mediante la técnica de reducción del MTT (Fig. 15). Las células se trataron durante 24 horas con diluciones seriadas de los compuestos, incluido el gangliósido sin modificar (GD1b) a modo de control, y en presencia del mitógeno EGF para promover la proliferación. En paralelo, se empleó como control del experimento la droga temozolamida, de origen no glicolipídico, que actualmente es el único tratamiento aprobado en clínica para el tratamiento de glioblastoma multiforme.

Los resultados indicaron que el gangliósido GD1b sin modificar no inhibió la proliferación de ninguna de las líneas tumorales, a la mayor concentración ensayada ($50 \mu M$; Fig. 15A, 15B), lo cual era esperable ya que en la bibliografía esta reportada su actividad mitogénica en este tipo de líneas tumorales (Romero-Ramirez y Nieto-Sampedro, 2004). En cambio, cuando introducimos un grupo acetilo en el ácido siálico terminal de GD1b, el gangliósido se tornó fuertemente inhibitorio. La actividad anti-proliferativa de O-Ac GD1b, neurostatina obtenida por síntesis química, fue similar a la reportada para la neurostatina extraída de cerebro de cerdo. Esta inhibió fuertemente el crecimiento de ambas líneas tumorales mostrando unos valores de ID_{50} de $2,00 \mu M$ en U373MG (Fig. 15A) y de $0,23 \mu M$ en C6 (Fig. 15B). La comparación de la actividad de la neurostatina con el control del gangliósido sin acetilar (GD1b), nos permite atribuir el cambio en la capacidad anti-proliferativa a la inserción del grupo acetilo en el ácido siálico terminal del gangliósido. Los derivados de GD1b dos, tres y cuatro veces O-acetilados en su estructura (Bi, Tri y Tetra-O-Ac GD1b) también fueron fuertemente inhibitorios al compararlos con los controles, presentando valores de ID_{50} de $2,54 \mu M$, $2,97 \mu M$ y $2,93 \mu M$ respectivamente para U373MG (Fig. 15A), y de $1,65 \mu M$, $3,56 \mu M$ y $4,01 \mu M$ respectivamente para C6 (Fig. 15B). Las concentraciones a las cuales los compuestos varias veces acetilados inhiben la proliferación son del mismo orden que la del compuesto mono-acetilado, aunque no mejoran su actividad, indicando que la adición de más O-acetilos a la neurostatina no mejora su actividad anti-proliferativa, y sugiriendo que el cambio que experimenta la molécula al

introducir la primera O-acetilación es el responsable del cambio en la capacidad inhibitoria de la células tumorales.

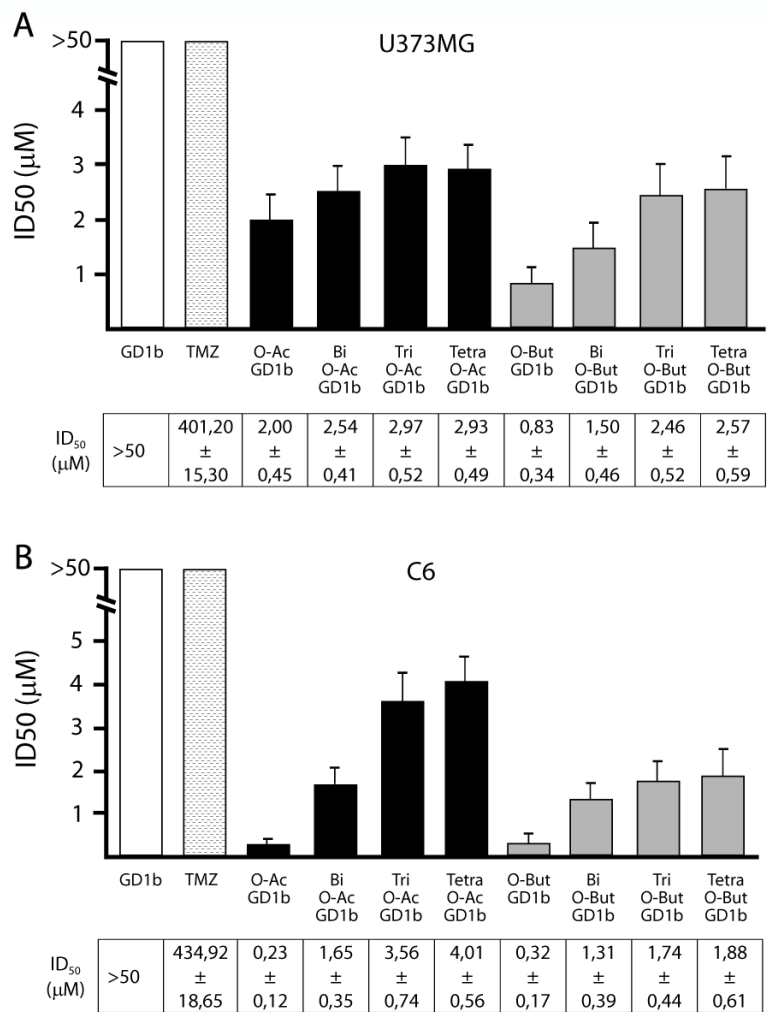


Figura 15. Actividad inhibitoria de los compuestos O-acetilados y O-butirilados derivados de GD1b sobre las líneas celulares de glioma U373MG y C6.

Actividad inhibitoria (ID₅₀, μM) de los gangliósidos O-acetilados y O-butirilados sobre la línea de astrocitoma humano U373MG (**A**) y la línea de glioma de rata C6 (**B**), evaluada mediante ensayo de reducción de MTT (24 horas), usando como mitógeno EGF (10ng/ml). Como controles, se evaluó la actividad inhibitoria del gangliósido GD1b y de la droga antitumoral no-gangliosídica temozolomida (TMZ). Los datos se expresan como media±SD de la ID₅₀ de cuatro experimentos realizados por cuadruplicado.

La modificación de GD1b con un grupo butirilo en lugar de un grupo acetilo en su siálico terminal, también produjo un cambio en la actividad del gangliósido. El derivado mono-butirilado (O-But GD1b) de la neurostatina presentó una capacidad anti-proliferativa muy elevada, superando en más de dos veces la actividad de la neurostatina en la línea de astrocitoma humano (ID₅₀=0,83μM en U373MG; ID₅₀=0,32μM en C6; Fig. 15A, 15B). Por lo tanto, una cadena carboxílica de mayor tamaño le confirió al compuesto una ligera mejoría en su capacidad frente al tumor. Del mismo modo que en el caso de la O-acetilación

múltiple, los compuestos con dos, tres y cuatro O-butilaciones en la estructura fueron sumamente inhibitorios, comparado con los controles, presentando valores de ID_{50} de 1,50 μ M, 2,46 μ M y 2,57 μ M, respectivamente en U373MG (Fig. 15A), y de 1,31 μ M, 1,74 μ M y 1,88 μ M respectivamente en C6 (Fig. 15B). Aun así, los compuestos varias veces butirilados no superaron la actividad del derivado mono-sustituido O-But GD1b, apoyando la hipótesis de que la primera O-sustitución es la clave para el cambio en la capacidad anti-tumoral de estos gangliósidos.

El control no glicosídico temozolamida, cuya ID_{50} fue de 401 μ M y 434 μ M en U373MG y C6, respectivamente (Fig. 15A, 15B), presentó una actividad anti-mitogénica unas 200 veces menor que la de los gangliósidos semi-sintéticos estudiados en este trabajo, lo que nos dio una idea de la gran capacidad anti-tumoral que poseen estos gangliósidos, ya que presentan actividad anti-proliferativa contra líneas tumorales de glioma a concentraciones muy bajas (de 4 μ M a 0,23 μ M).

Todos los gangliósidos químicamente modificados, tanto los derivados O-acetilados como los O-butilados, presentaron actividad inhibidora de la proliferación de las líneas celulares tumorales, tanto de astrocitoma humano, como de glioma de rata, mostrando un patrón de acción muy similar en ambas líneas (Fig. 15). La neurostatina sintetizada químicamente (O-Ac GD1b), presentó una actividad inhibitoria similar a la neurostatina natural, y aunque la adición de más O-acetilaciones a la estructura apenas mejoró su actividad inhibitoria, si lo hizo la sustitución del radical acetilo por el butirilo en el ácido siálico terminal de GD1b (Fig. 15). Los compuestos varias veces butirilados tampoco mejoraron la actividad del compuesto mono-butirilado. En todos los casos, la introducción de O-sustituciones aumentó dramáticamente la actividad inhibitoria de los gangliósidos, en comparación con la especie no modificada (GD1b), observándose un ligero aumento en la actividad inhibidora de los compuestos con radicales butirilos en comparación con los compuestos acetilados.

Teniendo en cuenta los resultados resaltados sobre la capacitada anti-tumoral *in vitro* de los gangliósidos semi-sintéticos en estudio, se seleccionaron, para realizar las siguientes aproximaciones en modelos anti-tumorales *in vivo*, los compuestos O-Ac GD1b, el análogo semi-sintético del compuesto natural neurostatina, y O-But GD1b, que presentó mayor capacidad anti-proliferativa que la neurostatina en las líneas tumorales ensayadas.

2.1.2. Evaluación de la estabilidad de los compuestos

En general, los compuestos O-butilados mostraron mayor actividad anti-tumoral *in vitro* que los compuestos O-acetilados, pudiendo ser debido a un aumento en la estabilidad del gangliósido. Para comprobar esta hipótesis se llevó a cabo un experimento de resistencia a hidrólisis alcalina (Tabla 10). Sometiendo ambos compuestos, O-Ac GD1b y O-But GD1b, a hidrólisis alcalina suave a diferentes tiempos, se observó que el compuesto acetilado se hidrolizó un 11,35% tras cinco minutos y un 41,46% tras veinte minutos de reacción (Tabla 10). Sin embargo, O-But GD1b en las mismas condiciones tardó más tiempo en hidrolizarse,

no observándose hidrólisis a los cinco minutos y presentando un porcentaje del 8,65% de hidrólisis a los veinte minutos (Tabla 10). Esta resistencia a la hidrólisis alcalina observada en el compuesto O-But GD1b indicó una mayor estabilidad del mismo, que pudo tener como consecuencia la mejora en la actividad anti-proliferativa sobre las líneas de astrocitoma humano U373MG y glioma de rata C6.

Compuesto	Tasa de Hidrólisis (5min)	Tasa de Hidrólisis (20min)
O-Ac GD1b	11,35%	41,46%
O-But GD1b	—	8,65%

Tabla 10. Estabilidad de los compuestos O-Ac GD1b y O-But GD1b.

Resistencia de los compuestos O-Ac GD1b y O-But GD1b a hidrólisis alcalina (5 y 20 minutos). Se representa el porcentaje de compuesto hidrolizado (GD1b) con respecto al total (hidrolizado+compuesto sin hidrolizar), analizado por TLC.

2.1.3. Efecto de la neurostatina y de O-But GD1b sobre la progresión del ciclo celular

Conociendo que los compuestos O-Ac GD1b (neurostatina) y O-But GD1b inhibían la proliferación de las líneas celulares tumorales de astrocitoma humano y glioblastoma de rata, se procedió a estudiar su efecto sobre la progresión del ciclo celular de las células tratadas con ambos gangliósidos. Para ello analizamos el ciclo celular de ambas líneas tumorales mediante citometría de flujo tras el marcaje con ioduro de propidio, habiendo tratado las células con el mitógeno EGF, o con el mitógeno junto con O-Ac GD1b u O-But GD1b (Fig. 16, 17). Como control negativo de proliferación se añadió a las células medio de cultivo sin el mitógeno EGF.

Al tratar la línea de astrocitoma humano U373MG durante 24 horas con el mitógeno EGF se observó como el número de células que se encontraban en fase G_0 - G_1 (Fig. 16B) disminuyó, comparando con el control sin EGF (Fig. 16A), pasando del 68,6% en el control negativo al 47,4% tras añadir EGF. Aunque que no se apreciaron cambios en el número de células en fase S, observamos un aumento en el número de células en fase G_2 -M, pasando del 14,9% al 36,8% en presencia del mitógeno (Fig. 16A, 16B). Como era de esperar, al añadir el mitógeno las células progresaron en el ciclo, aumentando el número de células en G_2 . Cuando las células fueron adicionalmente tratadas con neurostatina se produjo un descenso significativo en el número de células en fase G_2 -M, pasando de 36,8% a 27,8%, y un aumento de las células en fase G_0 - G_1 de 47,4% a 63,6%, sin producirse cambios en la fase S (Fig. 16C). O-Ac-GD1b provocó la parada de las células en G_0 - G_1 , revertiendo el efecto del mitógeno EGF y observándose un perfil similar al observado en el control sin mitógeno. El tratamiento con EGF y O-But GD1b produjo un efecto muy similar al observado con la neurostatina, disminuyendo el número de células en fase G_2 -M a 28,1% y aumentando el número de células en fase G_0 - G_1 al 62,3%, igualmente sin cambios en la proporción de células en fase S

(Fig. 16D). De manera general, los tratamientos con ambos gangliósidos revirtieron el efecto del mitógeno.

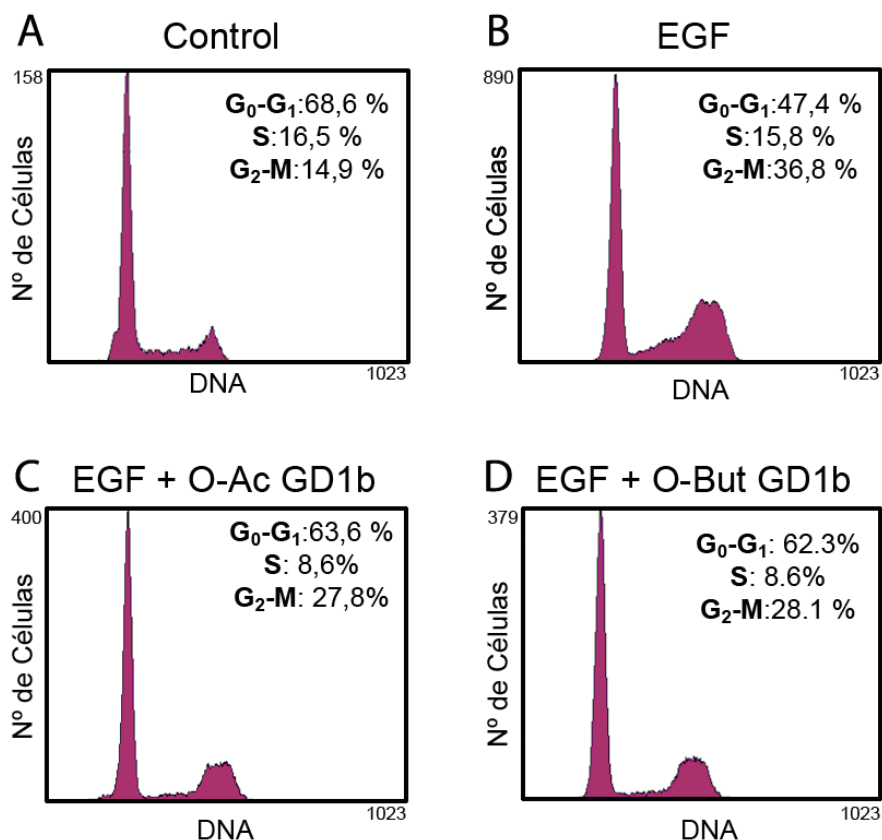


Figura 16. Efecto de O-Ac GD1b y O-But GD1b sobre el ciclo celular de células U373MG.

Células U373MG fueron tratadas con el medio control (DMEM, **A**), el mitógeno EGF (10ng/ml; **B**) o el mitógeno EGF (10ng/ml) suplementado con los gangliósidos O-Ac GD1b (2μM; **C**) u O-But GD1b (2μM; **D**), durante 24 horas. Las células fueron marcadas con yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo (n=4). En el eje de abscisas se indica el contenido en ADN y en el de ordenadas el número de células en cada punto del ciclo celular. En cada tratamiento se muestra el porcentaje de células correspondiente a cada fase del ciclo celular (G₀-G₁, S y G₂-M).

En la células de glioma de rata C6, el tratamiento con el mitógeno EGF causó un marcado cambio en el perfil del ciclo celular, con un gran aumento en la proporción de células en fase G₂-M, pasando de un 19,8% (control; Fig. 17A) a un 41,1%, y un descenso en el número de células en G₀-G₁, pasando de un 65,3% a un 47,3% (Fig. 17B). Cuando las células fueron adicionalmente tratadas con neurostatina, se produjo un descenso significativo del número de células en fase G₂-M, pasando de 41,1% a 26,5%, y una acumulación de las células en G₀-G₁, pasando de 47,3% a 58,6% (Fig. 17C). En el caso del tratamiento con EGF y O-But GD1b, disminuyó el número de células de la fase G₂-M a 22,6% y aumentó el número de células de la fase G₀-G₁ a 59,7% (Fig. 17D). De nuevo, el número de células en fase S no varió de manera destacable en respuesta a ningún tratamiento.

Los resultados obtenidos con ambas líneas tumorales fueron similares, provocando los tratamientos con neurostatina y O-But GD1b una reversión en el efecto del mitógeno EGF y

observándose perfiles de ciclo celular similares al control (Fig. 16, 17), no encontrándose diferencias significativas entre los comportamientos de O-Ac GD1b y O-But GD1b.

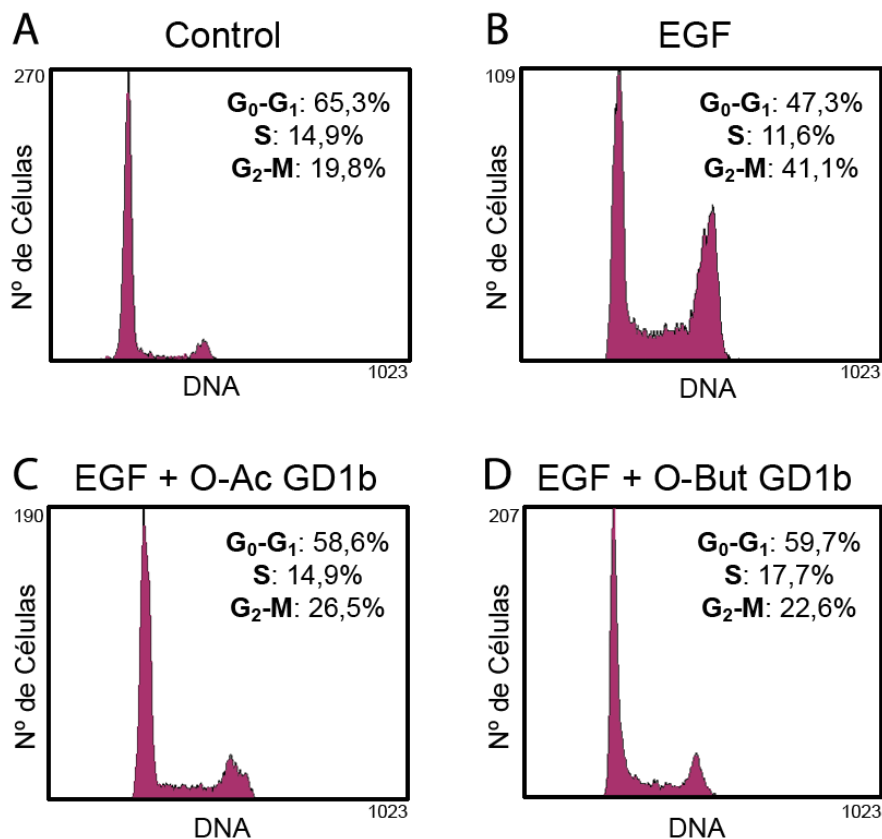


Figura 17. Efecto de O-Ac GD1b y O-But GD1b sobre el ciclo celular de células C6.

Células C6 fueron tratadas con el medio control (DMEM, **A**), el mitógeno EGF (10ng/ml; **B**) o el mitógeno EGF (10ng/ml) suplementado con los gangliósidos O-Ac GD1b (2μM; **C**) u O-But GD1b (2μM; **D**), durante 24 horas. Las células fueron marcadas con yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo (n=4). En el eje de abscisas se indica el contenido en ADN y en el de ordenadas el número de células en cada punto del ciclo celular. En cada tratamiento se muestra el porcentaje de células correspondiente a cada fase del ciclo celular (G₀-G₁, S y G₂-M).

2.1.4. Evaluación de la toxicidad de la neurostatina y de O-But GD1b

Con el fin de determinar como podrían afectar los compuestos O-Ac y O-But GD1b al sistema cerebral durante un paradigma experimental *in vivo*, y ensayar su posible toxicidad en células del sistema nervioso, se realizaron ensayos de actividad de los gangliósidos sobre cultivos de neuronas y astrocitos (Fig. 18). Se utilizó nuevamente la aproximación experimental de reducción de MTT en cultivo de neuronas de corteza embrionaria, observando la supervivencia de las mismas y en cultivos de astrocitos de corteza de postnatales, analizando su proliferación.

Tanto GD1b acetilado como butirilado inhibieron el crecimiento de astrocitos, como ya estaba descrito para la neurostatina natural en la bibliografía (Abad-Rodriguez y cols., 2000), con valores de ID₅₀ de 4,95±0,98 y 4,56±0,87μM, respectivamente (Fig. 18). Por otra

parte, los compuestos no presentaron toxicidad alguna sobre cultivos de neuronas a la máxima concentración ensayada (10 μ M; Fig. 18). La falta de toxicidad *in vitro* de los compuestos derivados de GD1b, O-Ac y O-But GD1b para células nerviosas, permitió proceder al estudio de los compuestos *in vivo*.

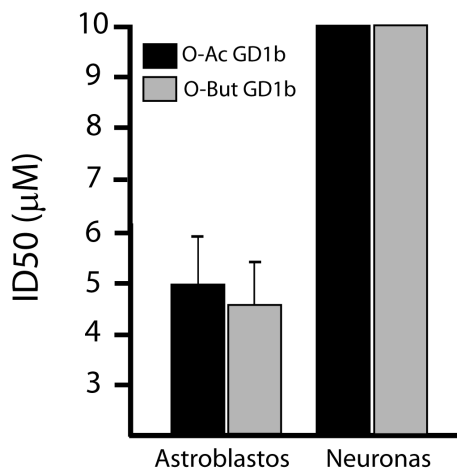


Figura 18. Evaluación de la toxicidad de O-Ac GD1b y O-But GD1b sobre astroblastos y neuronas.

Actividad de la neurostatina (O-Ac GD1b, barras negras) y de O-But GD1b (barras grises) sobre la proliferación de astroblastos o la supervivencia de neuronas. Para ambos parámetros se empleó un ensayo de reducción de MTT (24 horas), expresando los datos como media \pm SD de la ID₅₀ (μ M), de cuatro experimentos realizados por cuadruplicado.

2.2. Actividad *in vivo* de la neurostatina y O-But GD1b sobre el crecimiento de xenotransplantes de gliomas

2.2.1. Diseño experimental del tratamiento de xenotransplantes de gliomas

Con el fin de determinar la actividad anti-tumoral *in vivo* de O-Ac y O-But GD1b, se desarrollaron xenotransplantes de astrocitomas humanos (Fig. 19) o gliomas de rata (Fig. 20) en ratones desnudos hembra (Foxn1^{nu/nu}), evitando así problemas de rechazo entre especies, para un posterior tratamiento con los gangliósidos en estudio. Se implantaron células de astrocitoma humano U373MG o de glioma de rata C6 en el flanco de ratonas desnudas Foxn1^{nu/nu} y, una vez desarrollados los tumores, se trataron con los mencionados gangliósidos, con el control de vehículo (PBS) o con un control de GD1b sin modificar, para confirmar que los cambios observados eran debidos a la O-sustitución química introducida en dicho gangliósido.

Actividad anti-tumoral de la neurostatina y de O-But GD1b en xenotransplantes de células de astrocitoma humano U373MG

Se establecieron tumores de astrocitoma humano (U373MG), en los flancos de las ratonas desnudas, y se trataron con los compuestos semi-sintéticos O-Ac GD1b y O-But GD1b, o con los controles PBS (vehículo) y GD1b sin modificar (Fig. 19). El tratamiento consistió en la inyección intratumoral de 1 μ g de compuesto, dividido en 4 dosis, suministradas en días alternos. El crecimiento tumoral fue evaluado tras el tratamiento hasta el día 28, en el cual se dio por finalizado el experimento. En cada grupo experimental se

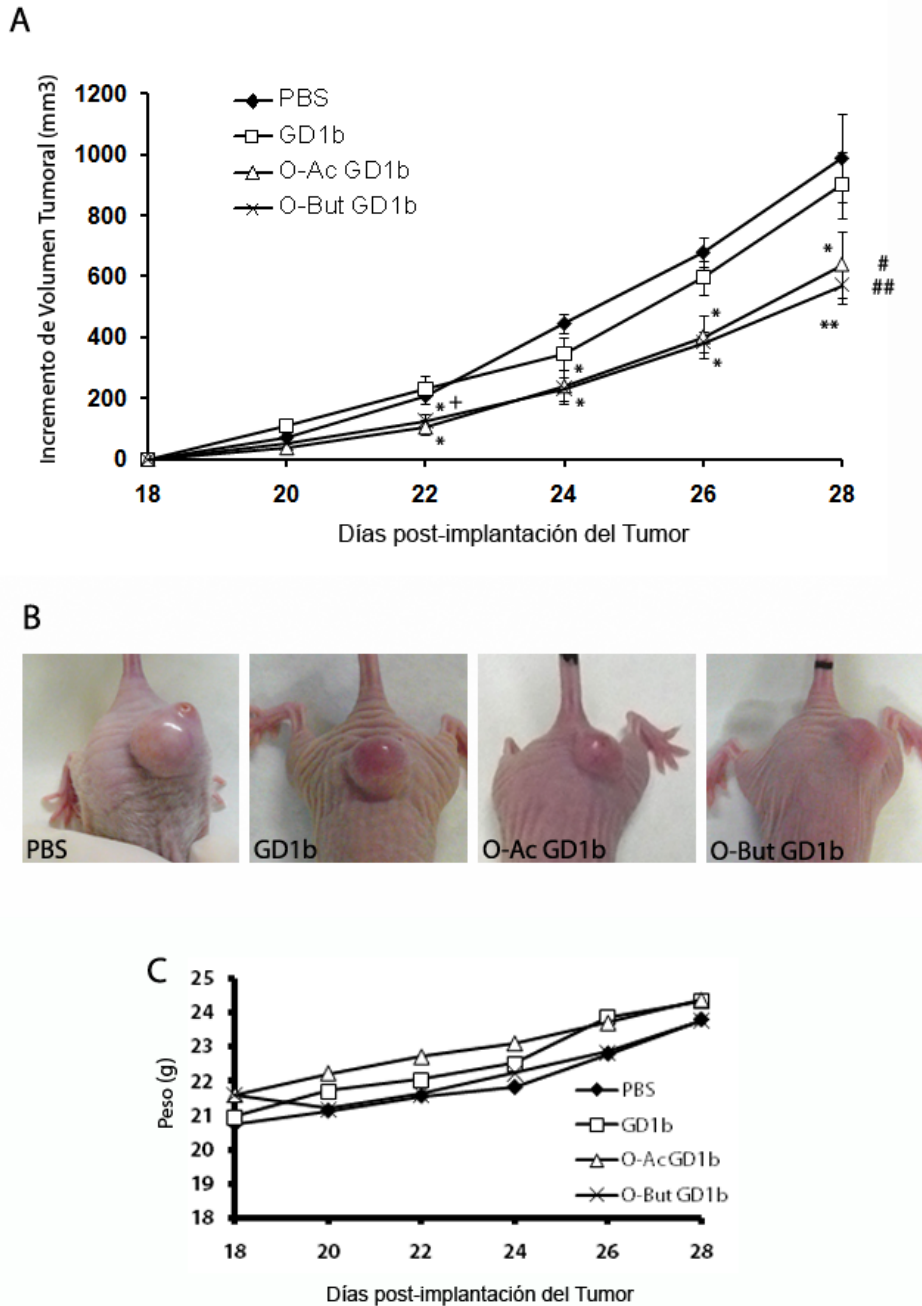


Figura 19. Efecto de O-Ac GD1b y O-But GD1b sobre el crecimiento de gliomas experimentales de células U373MG en ratones desnudos.

(A) Efecto a lo largo del tiempo de O-Ac GD1b y O-But GD1b sobre el crecimiento de xenotransplantes de células U373MG ($n=8$). Tras alcanzar el tamaño requerido ($\approx 120 \text{ mm}^3$; día 18), los tumores fueron tratados con PBS (vehículo, control; línea con triángulos negros), GD1b (control gangliosídico; línea con cuadrados blancos), O-Ac GD1b (neurostatina, línea con triángulos blancos) u O-But GD1b (línea con cruces). A cada animal se le administró $40 \mu\text{g/kg}$ del gangliosido correspondiente (en PBS), dividido en 4 inyecciones ($20 \mu\text{l}$), aplicadas intratumoralmente en días alternos (del día 18 al día 24). El volumen tumoral fue evaluado cada dos días. (B) Imágenes representativas de un tumor perteneciente a cada tratamiento al final del experimento (día 28). (C) Evolución del peso corporal (g) de los animales empleados en este estudio, como indicativo de la salud del sujeto. Significación estadística en el crecimiento tumoral puntual: * $p < 0.05$ vs. PBS, ** $p < 0.01$ vs. PBS, + $p < 0.05$ vs. GD1b. Significación estadística de la velocidad de crecimiento: # $p < 0.05$ vs. PBS, ## $p < 0.01$ vs. PBS. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

midió el volumen tumoral, calculándose el incremento de volumen en comparación con el inicio del tratamiento (Fig. 19A).

Los datos mostraron que los tumores tratados con el gangliósido sin modificar GD1b, se comportaron de manera similar a los tratados con PBS, alcanzando los dos grupos volúmenes próximos a 800 mm³ cuatro días después de finalizar el tratamiento (día 28; Fig. 19A, 19B). Sin embargo, los tumores tratados con dosis bajas de ambos gangliósidos modificados presentaron un volumen tumoral inferior a los controles, siendo las diferencias significativas desde el tercer día de tratamiento y hasta el final del experimento (Fig. 19A). A los tres días de tratamiento (día 22) los tumores tratados con O-Ac GD1b resultaron ser un 50% más pequeños que los tratados con PBS, y los tumores tratados con O-But GD1b fueron un 45% más pequeños que los tratados con PBS (Fig. 19A). En los días sucesivos estas diferencias se mantuvieron hasta la finalización del experimento, cuando el compuesto acetilado redujo en un 35% el crecimiento del tumor y el compuesto butirilado lo redujo en un 42% (Fig. 19A, 19B). Adicionalmente, se evaluó la tendencia en el crecimiento de los tumores mediante la comparación de las pendientes de las curvas de crecimiento (Fig. 19A), observándose una reducción significativa en el incremento de volumen tumoral en respuesta al tratamiento con ambos compuestos O-sustituídos, ligeramente mayor para el compuesto butirilado, aunque sin diferencias significativas con el acetilado, en comparación con el gangliósido sin modificar (GD1b) o con el control de PBS. Ninguno de los tratamientos afectó a la salud general de los animales, evidenciada por un aumento progresivo del peso corporal (Fig. 19C).

Actividad anti-tumoral de la neurostatina y de O-But GD1b en xenotransplantes de células de glioma de rata C6

Los tumores de glioma de rata C6, implantados y establecidos en ratonas desnudas, fueron tratados con los gangliósidos modificados o con los controles (PBS o GD1b) durante doce días, administrando los compuestos cada 3 días (Fig. 20). En total, cada animal recibió 1 µg de compuesto, y esta dosis reducida fue suficiente para observar diferencias entre los tratamientos. El crecimiento tumoral fue evaluado tras el tratamiento, hasta el día 33, en el cual se dio por finalizado el experimento (Fig. 20B). En cada grupo experimental se midió el volumen tumoral, calculándose el incremento de volumen en comparación con el volumen tumoral al comenzar el tratamiento.

En primer lugar, observamos que los tumores tratados con el gangliósido GD1b sin modificar experimentaron un incremento de volumen similar al de los tumores tratados con vehículo (PBS; Fig. 20A). Sin embargo, el tratamiento con los gangliósidos O-sustituídos inhibió el crecimiento de los tumores con respecto al efecto del gangliósido parental GD1b y respecto al control de vehículo (PBS; Fig. 20A, 20B), siendo las diferencias significativas desde el día 27 hasta la conclusión del experimento. O-But GD1b presentó una mayor actividad anti-tumoral, llegando a reducir el crecimiento del tumor en el día 33 del experimento en un 49% en comparación con el control de PBS, y en un 45% en comparación con el grupo

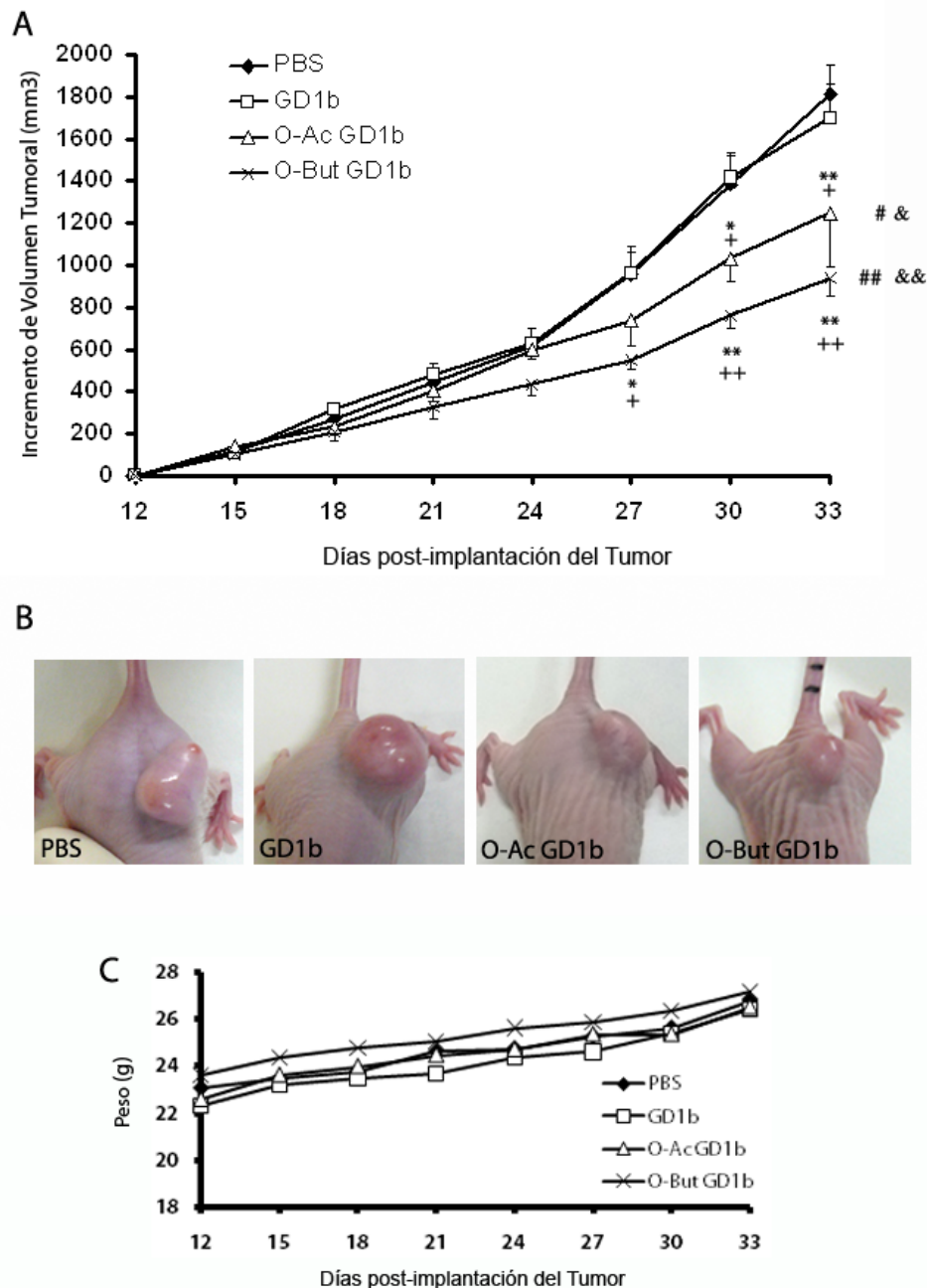


Figura 20. Efecto de O-Ac GD1b y O-But GD1b sobre el crecimiento de gliomas experimentales de células C6 en ratones desnudos.

(A) Efecto a lo largo del tiempo de O-Ac GD1b y O-But GD1b sobre el crecimiento de xenotransplantes de células C6 (n=8). Tras alcanzar el tamaño requerido ($\approx 120 \text{ mm}^3$; día 12), los tumores fueron tratados con PBS (vehículo, control; línea con triángulos negros), GD1b (control gangliosídico; línea con cuadrados blancos), O-Ac GD1b (neurostatina, línea con triángulos blancos) u O-But GD1b (línea con cruces). A cada animal se le administró $40 \mu\text{g/kg}$ del gangliósido correspondiente (en PBS), dividido en 5 inyecciones ($20 \mu\text{l}$), aplicadas intratumoralmente cada tres días (del día 12 al día 24). El volumen tumoral fue evaluado cada tres días. (B) Imágenes representativas de un tumor perteneciente a cada tratamiento al final del experimento (día 33). (C) Evolución del peso corporal (g) de los animales empleados en este estudio, como indicativo de la salud del sujeto. Significación estadística en el crecimiento tumoral puntual: * $p < 0.05$ vs. PBS, ** $p < 0.01$ vs. PBS, + $p < 0.05$ vs. GD1b, ++ $p < 0.01$ vs. GD1b. Significación estadística de la velocidad crecimiento: # $p < 0.05$ vs. PBS, ## $p < 0.01$ vs. PBS, & $p < 0.05$ vs. GD1b, && $p < 0.01$ vs. GD1b. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

tratado con GD1b (Fig. 20A; 20B). O-Ac-GD1b también inhibió el crecimiento del tumor, observándose una reducción en el crecimiento tumoral en el último día del experimento, del 32% respecto al control de PBS y del 27% respecto al grupo de GD1b, en el último día del experimento (Fig. 20A, 20B). También, evaluamos la velocidad de crecimiento de los tumores mediante la comparación de las pendientes de las curvas de crecimiento (Fig. 20A), observándose una reducción significativa en el incremento de volumen tumoral en respuesta al tratamiento con ambos compuestos O-sustituidos, ligeramente mayor para el compuesto butirilado, aunque sin diferencias significativas con el acetilado, en comparación con el gangliósido sin modificar (GD1b) o con el control de PBS. Ninguno de los tratamientos afectó a la salud general de los animales, evidenciada por un aumento progresivo del peso corporal (Fig. 20C).

2.2.2. Efecto de la neurostatina y de O-But GD1b sobre la proliferación y la progresión del ciclo celular en xenotransplantes de glioma C6

Para profundizar en el mecanismo de inhibición del crecimiento de los gliomas *in vivo* evaluamos la actividad anti-proliferativa de los gangliósidos modificados sobre tumores de rata (C6; Fig. 21) implantados en ratones desnudos, así como los cambios inducidos en marcadores de división celular (Fig. 22). Para ello, una vez desarrollados los xenotransplantes de células de glioma de rata C6, se trataron con una única dosis (5µg por animal) de neurostatina o de O-But GD1b. Los tumores se procesaron a las 30 horas y se analizaron mediante inmunohistoquímica y detección de proteína por western blot.

La capacidad de proliferación de los tumores fue medida mediante incorporación de BrdU, acoplada a detección inmunohistoquímica en secciones de tumores de los diferentes tratamientos (Fig. 21). Los resultados indicaron que el tratamiento de los gliomas, tanto con O-Ac GD1b como con O-But GD1b, disminuyó significativamente el número células BrdU positivas (Fig. 21B, 21C), y por tanto la división celular en el interior de los gliomas, en comparación con el vehículo control (PBS; Fig. 21A). La cuantificación de las células BrdU positivas denotó una disminución significativa del 48% en la proliferación de las células de glioma en respuesta al tratamiento con el compuesto acetilado y una disminución del 65% en respuesta al compuesto butirilado (Fig. 21D).

La disminución en la tasa de proliferación se correlacionó con la expresión del marcador de mitosis fosfo-histona H3 (pHH3), analizado por western blot (Fig. 22A, 22B). La histona H3 comienza a fosforilarse en la fase G₂ tardía del ciclo y se mantiene fosforilada durante la mitosis hasta la anafase, siendo por tanto útil para comparar la división tumoral que se observa en los tumores en respuesta a los diferentes tratamientos. En los tumores tratados con los gangliósidos modificados (O-Ac GD1b u O-But GD1b) la expresión de pHH3 fue tres veces menor que en el tumor control tratado con PBS (Fig. 22A, 22B), sin observarse diferencias entre los dos tratamientos utilizados. Por otra parte, se analizó la expresión de marcadores de ciclo celular importantes en la regulación del primer punto de control de la división, el paso de G₁ a S, como son la ciclina D1 (Fig. 22E), la quinasa CDK6 (Fig. 22F) y los

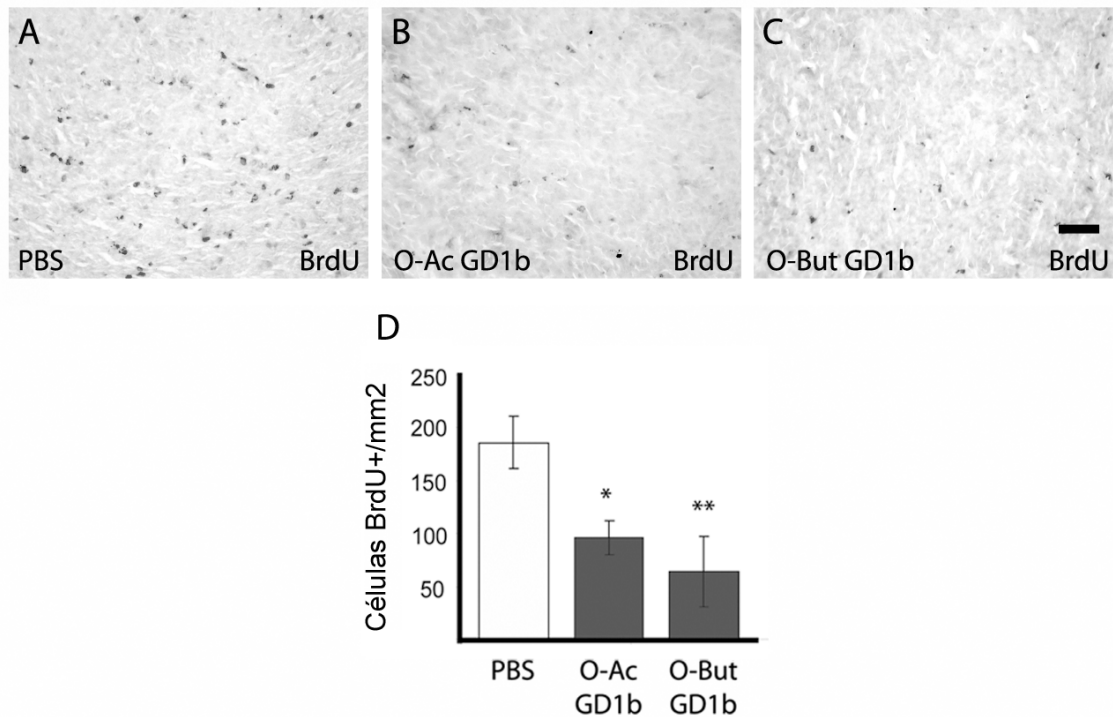


Figura 21. Efecto de O-Ac GD1b y O-But GD1b sobre la proliferación celular en gliomas experimentales de células C6 en ratones desnudos.

(A-C) Evaluación inmunohistoquímica de la incorporación de BrdU en xenotransplantes de células C6 en ratones desnudos, tras el tratamiento agudo con PBS (control, vehículo; **A**), O-Ac GD1b (**B**) u O-But GD1b (**C**). Los tumores fueron inyectados con PBS (vehículo; 20µl) o con 5µg de los compuestos (en 20µl de PBS), seguido de la administración intraperitoneal de 5 dosis secuenciales de BrdU, durante las siguientes 30 horas. (**D**) Cuantificación del número de células BrdU+ presentes en los tumores tratados. La cuantificación fue realizada en 10 secciones al azar de cada tumor (n=6), expresando los datos como media±SD del número de células BrdU+/mm² de tumor. Barra de aumento (A-C) en **C**, 100µm. Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

inhibidores del ciclo celular p21(Fig. 22D) y p27 (Fig. 22C). La expresión de la ciclina D1 aumenta durante la fase G₁ y forma complejos con quinasas como CDK6 que fosforilan la proteína de retinoblastoma (Rb), permitiendo la progresión del ciclo celular. Los inhibidores p21 y p27 bloquean la actividad quinasa de los complejos ciclina/CDK impidiendo la progresión del ciclo celular. La expresión tanto de la ciclina D1 como de CDK6 se vio altamente reducida en los tumores tratados con ambos gangliósidos modificados (Fig. 22A, 22E, 22F), respecto del control (PBS). Al tratar con O-Ac GD1b, la expresión de la ciclina D1 y CDK6 disminuyó significativamente respecto al control en 1,7 veces y 2,8 veces respectivamente. El tratamiento con O-But GD1b provocó una disminución en la expresión de ciclina D1 de 3 veces y de CDK6 en 3,4 veces, respecto a sus respectivos controles. En el caso de los inhibidores de ciclo celular, se observó la sobreexpresión de p27 y p21 en los tumores tratados con O-Ac u O-But GD1b (Fig. 22A, 22C, 22D), en comparación con los tumores tratados con vehículo (PBS). El tratamiento del tumor con O-Ac GD1b causó un aumento en la expresión de p27 de 5 veces con respecto al tumor control. El tratamiento con

O-But GD1b aumento la expresión de p27 de una manera más acusada, 6,4 veces respecto al tratamiento con PBS (Fig. 22C). En el caso del inhibidor p21, el aumento en respuesta al tratamiento con el compuesto acetilado fue también de 5 veces respecto al control, causando el tratamiento con el compuesto butirilado un aumento de 10 veces en la expresión del inhibidor (Fig. 22D). En todos los marcadores de ciclo celular estudiados observamos una tendencia a un mayor efecto del compuesto butirilado sobre el acetilado, aunque las diferencias no llegaron a ser significativas.

Por tanto, GD1b mono-acetilado o mono-butilado inhibieron el crecimiento tumoral de los gliomas implantados en ratones nude, impidiendo la progresión del ciclo celular y reduciendo por tanto la tasa de división del tumor.

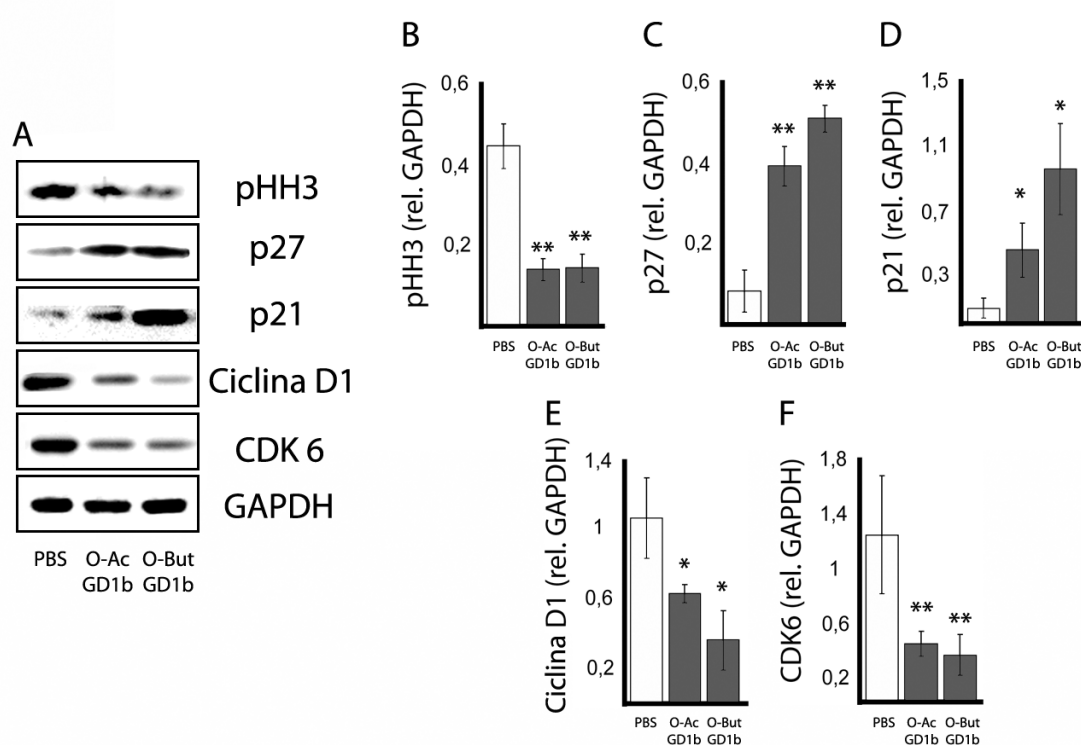


Figura 22. Efecto de O-Ac GD1b y O-But GD1b sobre la progresión del ciclo celular en gliomas experimentales de células C6 en ratones desnudos.

(A-F) Evaluación por Western blot de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en xenotransplantes de células C6, en respuesta al tratamiento con PBS (control), O-Ac GD1b u O-But GD1b. Los tumores fueron tratados con PBS (20μl) o con 5μg de los compuestos (20μl en PBS). Se analizó la expresión del marcador de mitosis fosfo histona H3 (pHH3; A, B), los inhibidores del ciclo celular p27 (A, C) y p21 (A, D), la ciclina D1 (A, E) y CDK6 (A, F), a las 30 horas del tratamiento. La cuantificación fue realizada en seis animales por grupo (n=6), en relación con la expresión del gen housekeeping GAPDH. Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

2.3. Actividad *in-vivo* de la neurostatina y O-But GD1b sobre el crecimiento de alotransplantes intracraneales de glioma de rata C6

2.3.1. Efecto de la neurostatina y de O-But GD1b sobre el crecimiento de alotransplantes intracraneales de glioma de rata C6

Los resultados previos indicaron que los compuestos derivados de GD1b provocaban la reducción del tamaño tumoral *in vivo*, en un modelo experimental de xenotransplantes de glioma de rata o humano en ratones desnudos (Fig. 19-22). En este modelo experimental, el sistema inmune del animal está deprimido al carecer de timo, evitándose así posibles problemas de rechazo de tumor. Como continuación quisimos evaluar la actividad de los compuestos semi-sintéticos en un modelo en el que el sistema inmune del animal estuviera intacto y el glioma fuera intracraneal, con el fin de evaluar, por una parte, la actuación del sistema inmunitario, y por otra, ver como actuaban los compuestos en el ambiente cerebral. Para ello se recurrimos a un modelo tumoral intracraneal, implantando células de la línea tumoral C6 en el estriado de ratas Sprague Dawley (Fig. 23). Una vez desarrollados los gliomas (durante siete días), se trataron con una única dosis de 5 μ g de O-Ac GD1b, O-But GD1b, GD1b o vehículo (PBS). Alternativamente, se desarrollaron tumores intracraneales empleando la línea celular tumoral C6 transfectada con GFP, con el fin de poder detectar adecuadamente el desarrollo del tumor, realizando el tratamiento del mismo modo (Fig. 23A). Previamente, se comprobó mediante ensayos de reducción de MTT que los compuestos O-Ac GD1b y O-But GD1b inhibían la proliferación de la línea C6-GFP a concentraciones similares que la línea C6 no transfectada (Fig. 23B; O-Ac GD1b=0,23 \pm 0,12 μ M para C6 y 0,33 \pm 0,15 μ M, para C6-GFP; ID₅₀ O-But GD1b=0,32 \pm 0,17 μ M para C6 y 0,40 \pm 0,16 μ M, para C6-GFP).

Los cerebros se procesaron a las 48 horas del tratamiento, se fijaron, se seccionaron y los tumores se visualizaron mediante técnicas inmunohistoquímicas, utilizando el marcador nestina en el caso de tumores desarrollados a partir de C6, o mediante la visualización directa de la proteína GFP en el caso de tumores desarrollados a partir de C6-GFP (Fig. 23A). El volumen tumoral de los individuos de cada grupo de estudio fue medido con ayuda del software de análisis de imagen AIS.

Atendiendo al efecto de los tratamientos control (PBS y GD1b), los resultados tanto de inmunohistoquímica como de la cuantificación del volumen tumoral total indican que GD1b produjo un aumento del crecimiento tumoral (Fig. 23D, 23G), en comparación con el tratamiento con el vehículo PBS (Fig. 23C, 23G). Sin embargo, el tamaño del tumor fue menor en los tumores tratados con O-but GD1b (Fig. 23F; 23G) y de manera más acusada con el tratamiento neurostatina (Fig. 23E, 23G). El compuesto O-Ac GD1b redujo significativamente el crecimiento tumoral en un 59,26% respecto del control de vehículo (PBS) y un 73,92% respecto a GD1b sin modificar (Fig. 23G). Igualmente, el compuesto O-But GD1b redujo significativamente el crecimiento del tumor con respecto al control en un 40,57%, y respecto a GD1b en un 61,93% (Fig. 23G).

En conclusión, ambos derivados de GD1b O-sustituídos inhibieron el crecimiento de gliomas intracraneales a concentraciones muy bajas (16,6 μ g/Kg de peso), siendo el derivado de GD1b acetilado el que mostró una leve mayor actividad anti-proliferativa en este modelo, sin llegar a ser significativa en comparación con el compuesto butirilado.

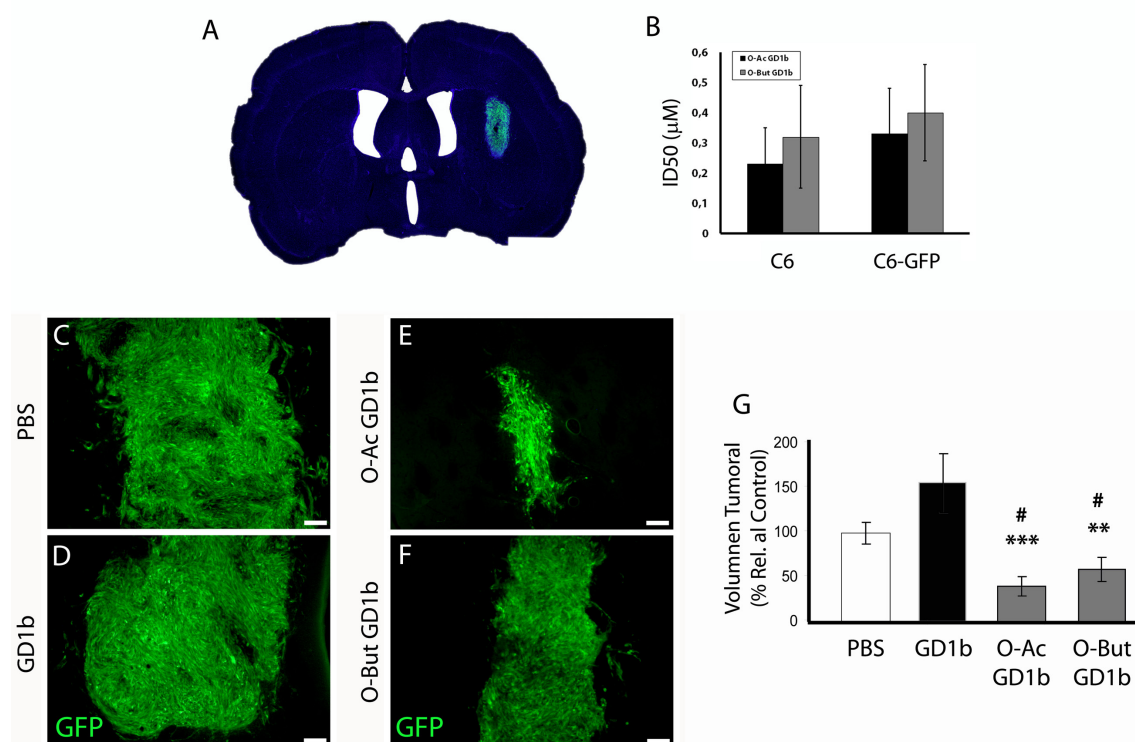


Figura 23. O-Ac GD1b y O-But GD1b reducen el crecimiento de gliomas intracraneales experimentales en rata.

(A) Implantación de gliomas intracraneales de células C6 o C6-GFP (verde) en el estriado de ratas Sprague-Dawley. En azul se muestran los núcleos marcados con Hoechst. (B) Evaluación de la actividad antiproliferativa de O-Ac GD1b (barras negras) y O-But GD1b (barras grises) en células C6 y células C6-GFP, mediante la técnica de reducción de MTT. Los datos se expresan como media \pm SD de la ID₅₀, de cuatro experimentos realizados por cuadruplicado. (C-F) Análisis inmunohistoquímico del crecimiento de gliomas C6 intracraneales, tras 7 días de implantación y 2 días de tratamiento. Tras la implantación del tumor (células C6 o C6-GFP), los animales fueron tratados con PBS (control, vehículo; 5 μ l; C), GD1b (5 μ g, control; D), O-Ac GD1b (5 μ g; E) u O-But GD1b (5 μ g; F), en PBS (5 μ l). (G) Representación del volumen tumoral correspondiente a cada tratamiento. La cuantificación del volumen tumoral se obtuvo midiendo el área proporcional marcada con GFP o nestina (inmunohistoquímica; verde) de todas las secciones con tumor, multiplicado por el grosor de la sección. Se utilizaron los valores de volumen tumoral de los controles tratados con PBS como referencia, expresando los datos como % de volumen tumoral con respecto al control. La cuantificación se realizó en 7 animales por grupo (n=7). Barra de aumento (C-F) 100 μ m. Significación estadística: #p<0.05 vs. PBS; **p<0.01 vs. GD1b, ***p<0.001 vs. GD1b. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

2.3.2. Actividad anti-proliferativa y pro-apoptótica de la neurostatina y de O-But GD1b sobre gliomas de rata C6

Con el fin de estudiar el efecto inhibitorio sobre los gliomas de los gangliósidos en estudio, evaluamos el efecto de la neurostatina y O-But GD1b sobre la división celular y a la actividad apoptótica en los tumores intracraneales (Fig. 24). Para ello se emplearon los marcadores de mitosis pH3 y de apoptosis caspasa-3, evidenciados mediante técnicas inmunohistoquímicas en muestras de gliomas intracraneales de rata tratados con los gangliósidos O-Ac GD1b u O-but GD1b, y con PBS como control.

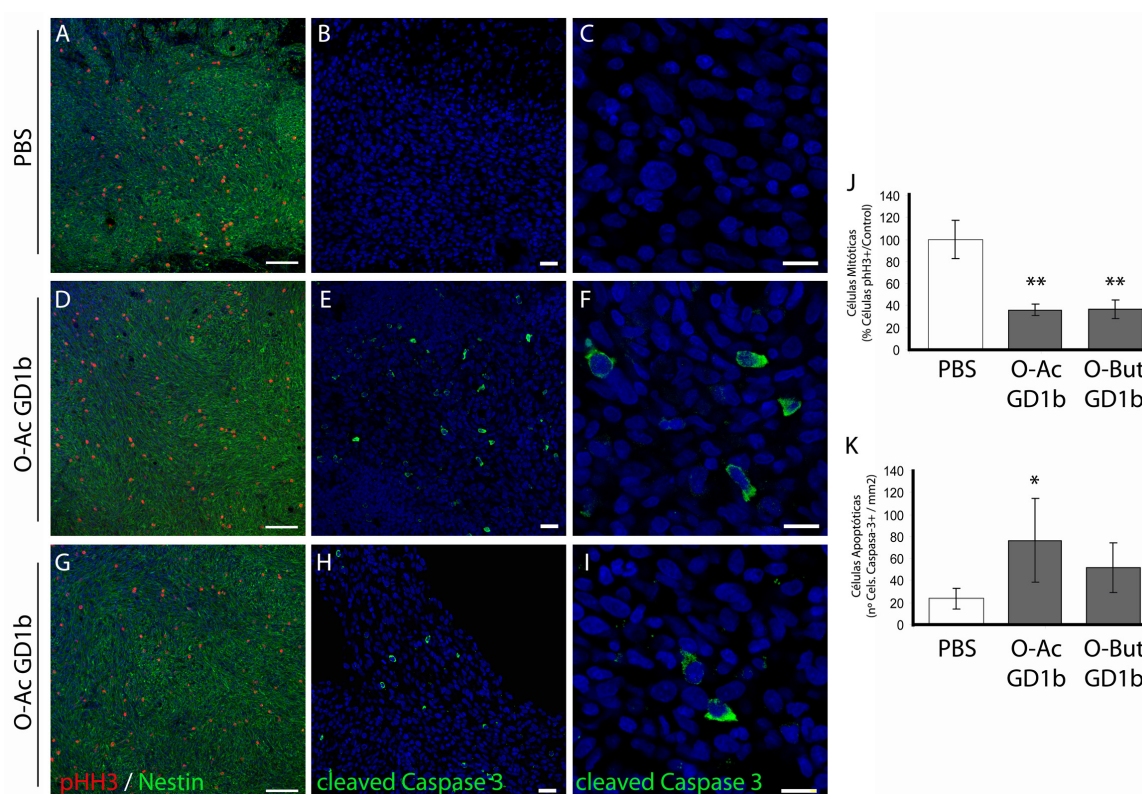


Figura 24. O-Ac GD1b y O-But GD1b reducen la proliferación e inducen apoptosis en tumores intracraniales.

Tras la implantación de los tumores y su desarrollo se trataron con PBS (control, vehículo; **A, B y C**), O-Ac GD1b (5µg; **D, E y F**) u O-But GD1b (5µg; **G, H e I**), y se evaluaron a las 48 horas. (**A, D, G**) Evaluación del efecto de los gangliósidos semi-sintéticos sobre la proliferación de gliomas intracraniales, analizado mediante inmunohistoquímica la actividad mitótica (pH3; rojo) en el interior tumoral (nestina; verde). En azul se muestran los núcleos marcados con Hoechst. (**J**) Cuantificación de la actividad mitótica (células pH3+; rojo), realizada en 7 animales por grupo y en 5-6 secciones/animal, expresando los datos como media±SD del % de células pH3+ con respecto al control negativo (PBS). (**B-C, E-F, H-I**) Evaluación de la tasa de apoptosis en los tumores intracraniales, mediante inmunohistoquímica frente a caspasa-3 activada (verde). En azul se muestran los núcleos marcados con Hoechst. (**K**) Cuantificación de la actividad apoptótica (células caspasa-3 activada+; verde), realizada en 7 animales por grupo y en 5-6 secciones/animal, expresando los datos como media±SD del n° de células caspasa-3+ por mm² de tumor. Barra de aumento (**A, D, G**) 100µm, (**B-C, E-F, H-I**) 20µm. Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

En los tumores tratados con PBS (Fig. 24A) se observó un elevado número de núcleos pHH3 positivos (rojo) dentro de la región tumoral, marcada con nestina (verde). El tratamiento de los tumores con O-Ac GD1b u O-But-GD1b provocó una reducción significativa en el número células tumorales positivas a pHH3 (Fig. 24D, 24G, 24J), reduciéndose por tanto el número de células en fase de mitosis. Esta reducción fue del 64% para ambos gangliósidos respecto del control (PBS; Fig. 24J), e implica que el tratamiento de tumores gliales intracraneales con los gangliósidos modificados provocó la disminución de la división tumoral.

La observación del inmunomarcaje para caspasa-3 activada (verde), indicó aparentemente que los tumores controles (tratados con PBS; Fig. 24B, 24C) no presentan células apoptóticas. Sin embargo, los tumores tratados con el compuesto butirilado (Fig. 24H, 24I) y, sobre todo, con el compuesto acetilado (Fig. 24E, 24F) presentaron un aumento de 2,2 veces y 3,2 veces, respectivamente, en el número de células caspasa-3 positivas (Fig. 24K), apuntando a un efecto pro-apoptótico de los gangliósidos estudiados.

2.3.3. Efecto de la neurostatina y O-But GD1b sobre la regulación de la infiltración inmune en gliomas intracraneales C6

La diferencia principal entre los modelos animales usados en este trabajo para evaluar la actividad anti-tumoral de los compuestos propuestos, radica en la participación del sistema inmune. Los tumores implantados en ratones desnudos se desarrollan en un sistema con la respuesta inmune deprimida, mientras que los alotransplantes intracraneales de C6 se desarrollaron en un ambiente con el sistema inmunitario intacto. Por esta razón, analizamos la implicación del sistema inmune en el modelo de alotransplante de glioma de rata (Fig. 25), mediante la evaluación inmunohistoquímica de la infiltración de células T (CD3+) y macrófagos (CD68+) en los gliomas intracraneales tratados con O-Ac GD1b, O-But GD1b o PBS (control).

Cuando los tumores fueron tratados con PBS como control, se observó una reducida infiltración de células inmunes en el parénquima del tumor, tanto de células CD68 positivas (macrófagos; Fig. 25A), como de células CD3 positivas (células T; Fig. 25D). El tratamiento de los tumores con O-Ac GD1b indujo un incremento significativo de 10,5 veces en la infiltración de macrófagos al interior del tumor (Fig. 25B, 25G), con un efecto similar del compuesto O-But GD1b que aumentó 5,5 la cantidad de macrófagos en la zona tumoral (Fig. 25C, 25G). La infiltración de células T en el parénquima tumoral se vio también significativamente aumentada con el tratamiento con ambos gangliósidos en comparación con el control, como se observa en las imágenes y en los contajes de la inmunohistoquímica frente a CD3. El tratamiento con el compuesto acetilado aumentó el número de linfocitos en el interior del tumor 21 veces (Fig. 25E, 25H), y en los tumores tratados con el compuesto butirilado el aumento fue de 39 veces (Fig. 25F, 25H).

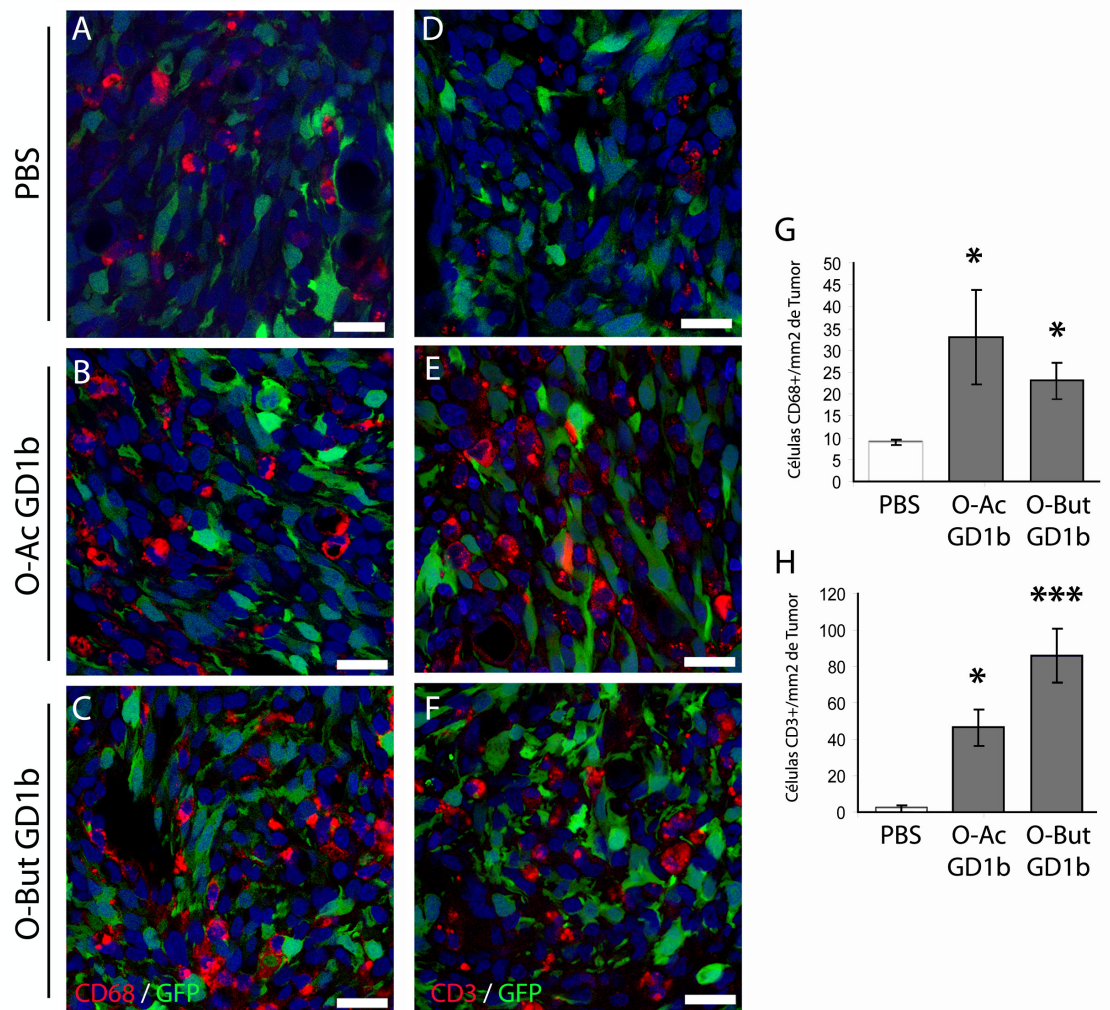


Figura 25. El tratamiento de gliomas intracraniales con O-Ac GD1b u O-But GD1b induce la infiltración de células inmunes. (A-H) Análisis del efecto de O-Ac GD1b u O-But GD1b en la infiltración de macrófagos (CD68+; rojo; A-C, G) o células T (CD3+; rojo; D-F, H) en el parénquima de gliomas intracraniales de células C6. Tras el establecimiento del tumor (GFP, verde), los animales fueron tratados con PBS (control, vehículo; A, D), O-Ac GD1b (B, E) u O-But GD1b (C, F), caracterizando la infiltración inmune por inmunohistoquímica. La cuantificación se realizó en 7 animales por grupo y en 5-6 secciones/animal (G, H), expresando los datos como media \pm SD del nº de células CD68+ o CD3+ por mm² de tumor). En azul se muestran los núcleos marcados con Hoechst. Barra de aumento (A-F) 20 μ m. Significación estadística: *p<0.05, ***p<0.001. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

Por tanto, el tratamiento con los compuestos derivados de GD1b, O-Ac GD1b y O-But GD1b, resultó efectivo para la reducción del crecimiento de tumores gliales intracraniales, reduciendo la proliferación e induciendo la muerte de las células tumorales, y facilitando la infiltración de células inmunes en el parénquima tumoral.

3. MECANISMO DE ACCIÓN ANTI-TUMORAL DE LA NEUROSTATINA

3.1. Efecto de la neurostatina sobre la progresión del ciclo celular de las células tumorales

3.1.1. La división celular de las células tumorales es inhibida por la neurostatina

Como indicaron resultados anteriores, la neurostatina inhibió la proliferación del 50% de las células de la línea de astrocitoma humano U373MG a una concentración de 2 μ M (Fig. 15). Para estudiar más a fondo las bases moleculares de la inhibición de la proliferación tumoral causada por la neurostatina, estudiamos su efecto sobre la mitosis de la línea de astrocitoma humano U373MG, midiendo la cantidad de proteína histona H3 fosforilada mediante western blot e inmunocitoquímica (Fig. 26). La histona H3 comienza a fosforilarse en la fase G₂ tardía y se mantiene fosforilada durante la mitosis hasta la anafase. Para ello las células tumorales, deprivadas de suero durante 36 horas, se pre-trataron con neurostatina (O-Ac-GD1b; 2 μ M) durante una hora, y posteriormente se añadió el mitógeno EGF (10ng/ml) para promover la proliferación. Paralelamente, tratamos células con el mitógeno EGF (10ng/ml) únicamente como control positivo. Los tratamientos se prolongaron durante 12, 24 y 48 horas, porque los ciclos de división de esta línea tumoral son largos. Como control negativo de proliferación se usaron cultivos de células sin EGF (t=0).

Los western blots de las células tratadas con el mitógeno EGF indicaron un aumento progresivo en la cantidad de histona H3 fosforilada frente al tratamiento con el mitógeno EGF, respecto al control negativo (Fig. 26A, 26B). Éste aumento se evidenció a las 12 horas y llegó a ser máximo a las 24 horas del tratamiento con EGF (Fig. 26A, 26B). En las células que fueron pre-tratadas con neurostatina la expresión de pHH3 disminuyó hasta valores cercanos al control negativo (tiempo 0) a las 12 y 24 horas, siendo sus niveles a las 48 horas más bajos que el control (Fig. 26A, 26B). A las 24 horas del tratamiento, momento de mayor expresión de pHH3 en las células tratadas con EGF, el tratamiento con neurostatina redujo la fosforilación de la histona H3 3,5 veces, llegando a reducirse 4,3 veces a las 48 horas (Fig. 26A, 26B).

La evaluación inmunohistoquímica de la expresión de pHH3, realizada a las 24 horas del tratamiento de las células, mostró la presencia de un reducido número de células U373MG (rojo; GFAP) fosfo-histona H3 positivas en respuesta al tratamiento control (Fig. 26C, 26E). Sin embargo, el tratamiento con EGF provocó un aumento en la proliferación celular, observándose un mayor número de células marcadas (Fig. 26C, 26D, 26E). El tratamiento simultáneo con EGF y neurostatina redujo significativamente el número de células marcadas frente a pHH3, llegando a observarse un menor número de células pHH3 positivas que en el control (Fig. 26C, 26E).

Por otra parte, y como ya se mencionó anteriormente (apdo 2.1.3), los ensayos de citometría de flujo con esta misma línea tumoral de astrocitoma humano mostraron cómo el tratamiento conjunto con neurostatina y el mitógeno EGF durante 24h provocó un

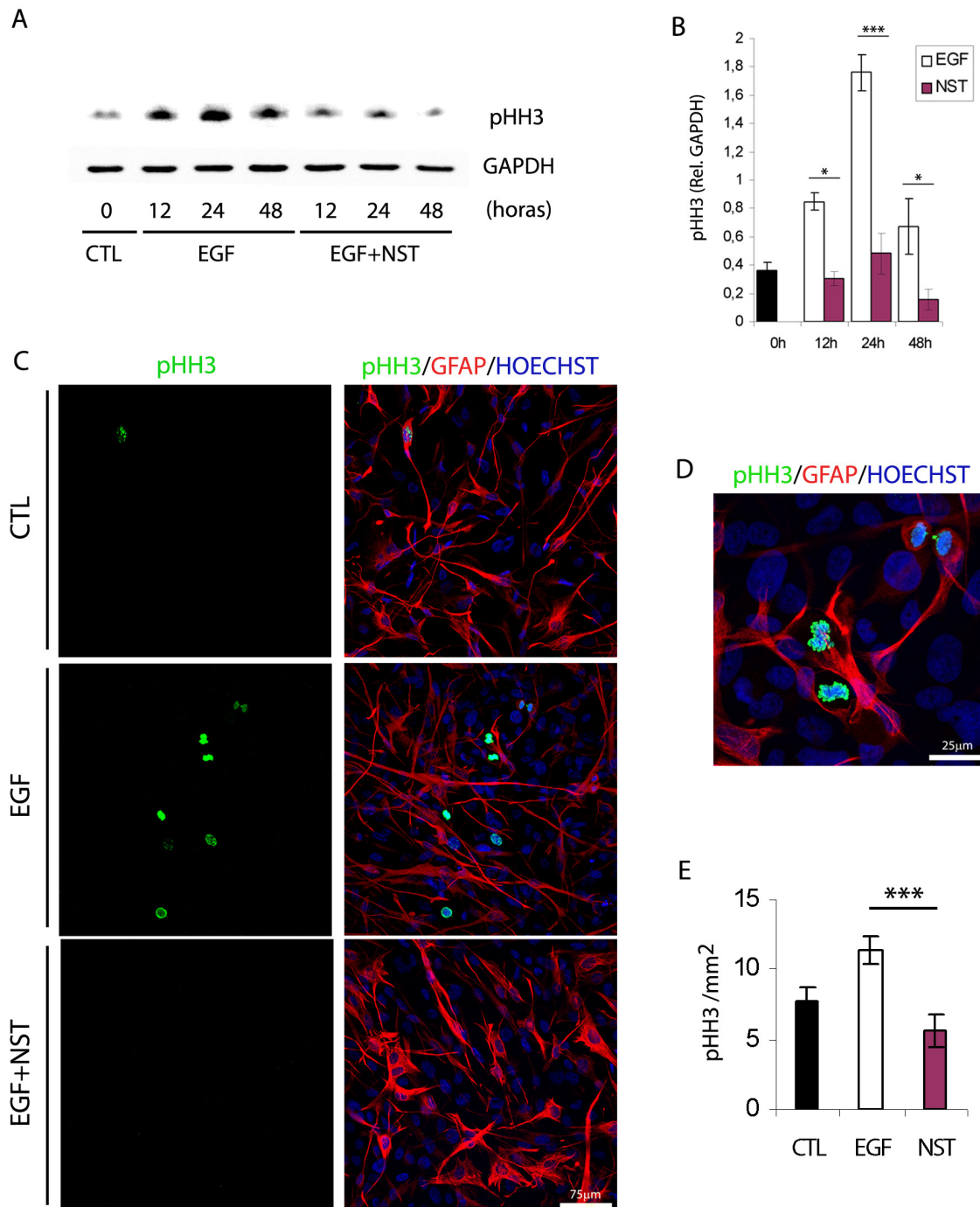


Figura 26. O-Ac GD1b o neurostatina reduce la actividad mitótica de células tumorales.

(**A**, **B**) Cuantificación de la expresión de la forma fosforilada de la Histona H3 (pHH3), marcador de mitosis, en células U373MG en respuesta a DMEM (control negativo; CTL; barra negra), EGF (control positivo; barras blancas) o EGF+neurostatina (NST; O-Ac GD1b; barras púrpura), mediante western blotting. La expresión de pHH3 fue evaluada entre las 0 y las 48 horas de tratamiento. (**B**) La cuantificación de la expresión de pHH3 se realizó empleando GAPDH como gen de expresión constante (housekeeping gene). Los datos se expresan como media±SD de la densidad óptica de pHH3/GAPDH (n=3). (**C-E**) Análisis inmunocitoquímico de la expresión de pHH3 (verde) en células U373MG (GFAP+; rojo) en respuesta a DMEM (control negativo; CTL; barra negra), EGF (control positivo; barra blanca) o EGF+neurostatina (NST; O-Ac GD1b; barra púrpura)(24 horas). (**D**) Detalle del marcaje frente a pHH3 en células tratadas con EGF. (**E**) La cuantificación de la expresión de pHH3 se expresa como media±SD del nº de células pHH3+/mm². Barra de aumento (**C**) 75µm, (**D**) 25µm. Significación estadística: *p<0.05, ***p<0.001. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

significativo descenso del número de células en fase G₂-M respecto al tratamiento con el mitógeno solamente (EGF), aumentado las células en G₀-G₁, observándose un patrón de ciclo celular semejante al control (Fig. 16). Luego la neurostatina logró bloquear el efecto mitogénico del EGF.

Por tanto, los resultados obtenidos indicaron que la neurostatina provocó una reducción de la entrada en mitosis de las células de astrocitoma humano U373MG, aumentando el número de células en fase G₀-G₁, e inhibiendo la proliferación celular del tumor a concentraciones de gangliósido muy bajas.

3.1.2. Efecto de la neurostatina sobre la progresión del ciclo celular

Sabiendo que la neurostatina afecta directamente a la progresión del ciclo celular, quisimos estudiar su efecto sobre la expresión de las diferentes proteínas que regulan la transición entre las diferentes fases del ciclo. El estudio se focalizó en el punto de restricción (R) que controla el paso de la fase G₁ a la fase de síntesis (S), evaluando la expresión de proteínas promotoras del ciclo celular como son ciclinas y quinasa dependientes de ciclinas (CDKs) (Fig. 27), inhibidores de ciclo celular, como son p21^{waf1/cip1} y p27^{kip1} (Fig. 28), y la activación de proteína de retinoblastoma (Rb; Fig. 29). Como aproximación experimental utilizamos células de la línea de astrocitoma humano U373MG, las cuales fueron deprivadas de suero durante 36 horas, para posteriormente ser pretratadas con neurostatina (O-Ac-GD1b; 2μM) durante una hora, añadiendo posteriormente el mitógeno EGF (10ng/ml), para promover la proliferación. Como control, utilizamos células tratadas únicamente con el mitógeno EGF (10ng/ml). Las células fueron incubadas durante 12, 24 y 48 horas después de añadir el tratamiento, a fin de estudiar el ciclo completo de división celular, ya que los ciclos de división de esta línea tumoral son largos. Como control negativo de proliferación se incubaron células sin EGF (t=0).

El tratamiento con neurostatina reduce los niveles de los complejos Ciclina-CDK

Los complejos formados por ciclinas y CDKs son relevantes para la progresión del ciclo celular, y se pueden utilizar como marcadores del punto de control de la transición de G₁ a S. Los niveles de la ciclina D deben aumentar para que el ciclo de división prosiga, lo que se consigue gracias a la acción de mitógenos como EGF. La ciclina D forma complejos con las CDKs, que fosforilan a la proteína Rb, para desbloquear su acción a modo de freno de la progresión del ciclo.

Los resultados indicaron que el mitógeno EGF provocó un aumento en la expresión de las ciclinas D1 y D3 en las células de astrocitoma humano (Fig. 27A, 27B, 27C). En el caso de la ciclina D1 su expresión aumentó progresivamente, observándose niveles máximos a las 24 horas. La neurostatina provocó una disminución en la activación inducida por EGF (Fig. 27A, 27B; 27C), alcanzándose valores de expresión similares al control sin EGF (t=0). Las mayores deferencias se observaron a las 24 horas, cuando el tratamiento con neurostatina redujo en

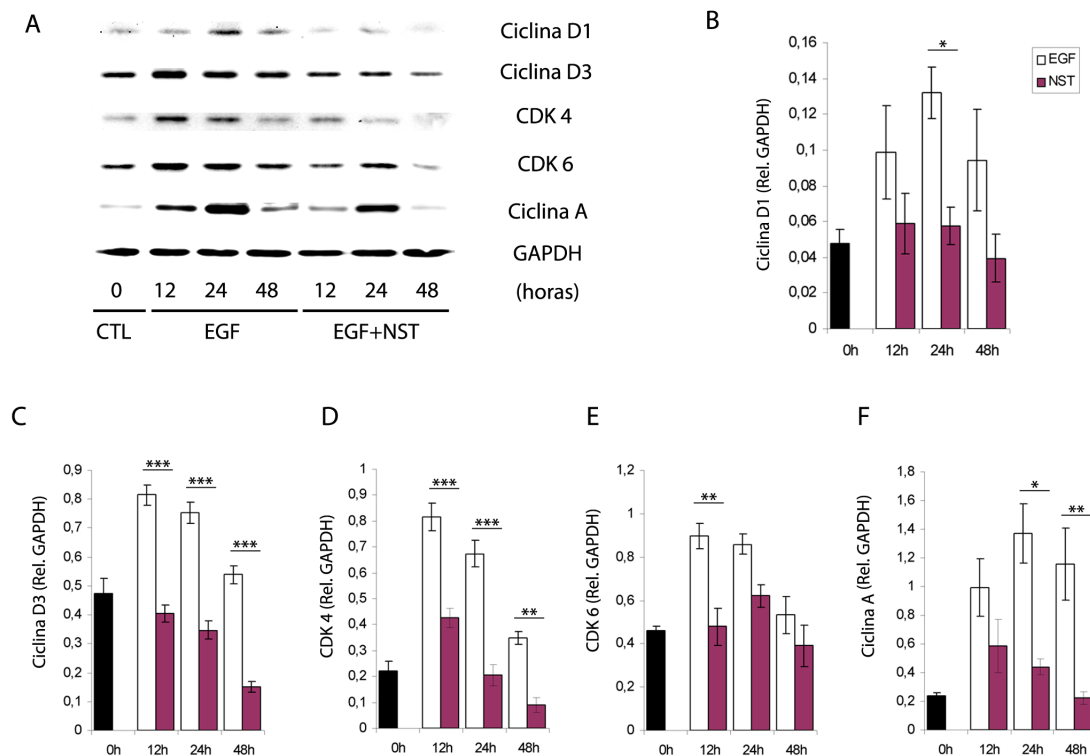


Figura 27. La neurostatina inhibe la expresión de los complejos ciclina/CDK reguladores del ciclo celular.

(A-F) Evaluación mediante western blotting de la expresión de ciclina D1 (B), ciclina D3 (C), CDK4 (D), CDK6 (E) y ciclina A (F) en células U373MG en respuesta a DMEM (control negativo; CTL; barras negras), EGF (control positivo; barras blancas) o EGF+neurostatina (NST; O-Ac GD1b; barras púrpura). La expresión de estas proteínas fue evaluada entre las 0 y las 48 horas de tratamiento. (B-F) Cuantificación de la expresión de las proteínas ciclinas y CDKs, empleando GAPDH como gen de expresión constante (housekeeping gene). Los datos se expresan como media±SD de la densidad óptica de ciclina D1, ciclina D3, CDK4, CDK6 o ciclina A/GAPDH, evaluadas en al menos tres experimentos diferentes (n=3). Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

2,3 veces la expresión de ciclina D1 inducida por el tratamiento con el mitógeno (Fig. 27B). En el caso de la ciclina D3 las diferencias fueron mayores, siendo el aumento de expresión provocado por el EGF completamente contrarrestado por la neurostatina, observándose niveles de proteína mas bajos que en el control sin mitógeno. La expresión de ciclina D3 se redujo 2 veces a las 12 horas y las diferencias aumentaron con el tiempo, observándose una reducción en la expresión de ciclina D3 de 3,5 veces a las 48 horas del tratamiento (Fig. 27C).

Las ciclinas D1 y D3 forman complejos con las proteínas CDK4 y CDK6, por lo que estudiamos la expresión de estas últimas en nuestro modelo (Fig. 27A, 27D, 27E). El tratamiento de las células con el mitógeno EGF provocó un dramático aumento en la expresión de CDK4 a las 12 horas, y aunque la expresión disminuyó a las 24 y 48 horas siguió manteniéndose elevada, en comparación con el control negativo (Fig. 27D). La reducción en la expresión de CDK4 provocada por la neurostatina fue de 2 veces tras 12 horas de tratamiento, efecto que se fue incrementando con el tiempo, siendo la reducción de 3,3

veces a las 24 horas y de 3,88 veces a las 48 horas (Fig. 27A, 27D). La expresión de CDK6 aumentó a las 12 horas del tratamiento con EGF y disminuyó paulatinamente en el tiempo (Fig. 27E). El tratamiento con neurostatina, junto con el mitógeno, disminuyó la expresión de la proteína a las 12 horas hasta los valores del control negativo (sin EGF), manteniéndose este efecto en el tiempo, aunque sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos (Fig. 27A, 27E). Por tanto, la neurostatina revertió el efecto de EGF, provocando la disminución de la expresión de las proteínas formadoras de los complejos ciclina D1, ciclina D3, CDK4 y CDK6, lo cual influiría directamente en la progresión del ciclo celular.

Estudiamos también la expresión de la ciclina A (Fig. 27A, 27F), proteína participante en la progresión de la fase G₂ a la mitosis (M), mediante western blot. Los resultados indicaron que el tratamiento con el mitógeno (EGF) aumentó fuertemente la expresión de la ciclina A (Fig. 27F), produciéndose en etapas más tardías (24h) que la sobre-expresión de las ciclinas D. Al tratar con neurostatina, junto con el mitógeno, la expresión de la ciclina A se fue reduciendo paulatinamente en el tiempo, llegando a reducirse en 5,1 veces a las 48 horas, presentando así valores de expresión similares a los observados en el control sin EGF (t=0; Fig. 27A, 27F). La disminución observada en la expresión de la ciclina A concuerda con lo esperado, si tenemos en cuenta que los complejos ciclina/CDKs que intervienen en la progresión del ciclo a nivel de G₁-S presentan una expresión disminuida.

La neurostatina aumenta la expresión de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27

Las proteínas p21^{cip1} y p27^{kip1} son inhibidores del ciclo celular al regulan la actividad de los complejos ciclina/CDKs, formando complejos ternarios con ellos e inhibiendo la actividad quinasa de las CDKs, encargada de la fosforilación de la proteína de retinoblastoma (Rb).

Cuando las células de astrocitoma humano U373MG fueron tratadas con neurostatina, junto con el mitógeno EGF, la expresión del inhibidor p21 se vio fuertemente aumentada (Fig. 28A, 28B). La diferencia de expresión con respecto al tratamiento con el mitógeno se evidenció desde las 12 horas, produciéndose un aumento progresivo en la cantidad de p21, siendo el incremento de expresión respecto al control de 1,7 veces a las 24 horas, y llegando a aumentar a 2,5 veces a las 48 horas (Fig. 28B). La expresión del inhibidor p27 también aumentó significativamente al tratar las células con neurostatina, observándose el pico de mayor expresión a las 24 horas de tratamiento, con un incremento de 1,6 veces (Fig. 28A, 28B). A las 48 horas se observó un aumento de expresión en 1,8 veces respecto al control positivo (EGF; Fig. 28B).

El aumento en la expresión de estos dos inhibidores de ciclo celular va a determinar la parada de las células en la fase G1 del ciclo, condicionando la progresión del ciclo celular y de la división de la célula tumoral.

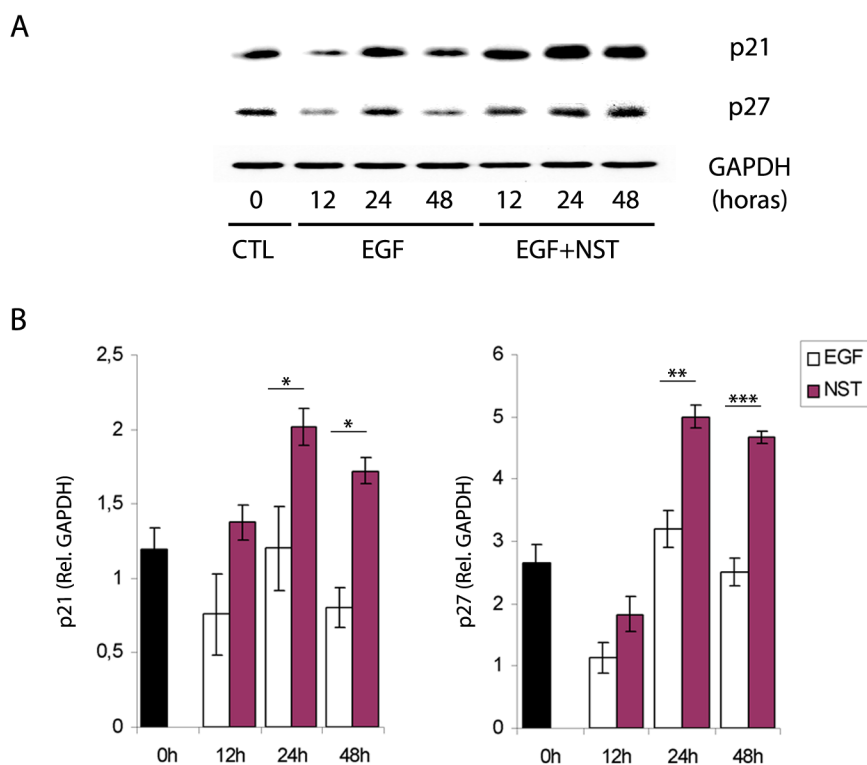


Figura 28. La neurostatina induce la expresión de los inhibidores del ciclo celular p21 y p27. (A, B) Evaluación mediante western blotting de la expresión de p21 y p27 en células U373MG en respuesta a DMEM (control negativo; CTL; barras negras), EGF (control positivo; barras blancas) o EGF+neurostatina (NST; O-Ac GD1b; barras púrpura). La expresión de estas proteínas fue evaluada entre las 0 y las 48 horas de tratamiento. (B) Cuantificación de la expresión de p21 y p27, empleando GAPDH como gen de expresión constante (housekeeping gene). Los datos se expresan como media \pm SD de la densidad óptica de p21 o p27/GAPDH (n=3). Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

La neurostatina aumenta la inactivación de la proteína retinoblastoma (Rb)

La proteína de retinoblastoma (Rb) es fundamental para la progresión del ciclo celular, ya que se encarga de bloquear al factor de transcripción que determina la progresión de la división. La fosforilación de esta proteína provoca su separación del factor de transcripción E2F, lo que permite la transcripción de los genes necesarios para la transición a la fase de síntesis. Los complejos ciclina/CDKs estudiados anteriormente están encargados de fosforilar al Rb e inactivarla y, como se ha observado, la expresión de estos complejos estaba disminuida en las células tratadas con neurostatina. Los inhibidores de ciclo p21 y p27 se encontraron sobre-expresados en las células tratadas con neurostatina, interfiriendo a su vez en la actividad de los complejos ciclina/CDKs. Todo esto nos llevó a suponer que la proteína Rb podría estar alterada en el sistema tratado con neurostatina. Por ello se estudió la expresión de Rb y su inactivación, mediante la fosforilación de tres residuos diferentes de Rb, las serinas (Ser) 780, 807 y 811.

El análisis mediante western blotting mostró que, mientras que la cantidad de Rb se mantuvo más o menos constante en los diferentes tratamientos y a distintos tiempos, su fosforilación varió (Fig. 29). Por tanto, la inactivación de Rb, representada como fosforilación de la proteína respecto a la cantidad de proteína total, fue diferente al tratar las células con EGF y neurostatina. A tiempo cero los tres residuos estudiados de Rb aparecen mínimamente fosforilados (Fig. 29A, 29B). Al añadir EGF a las células, la fosforilación de Rb en el residuo Ser₇₈₀ aumentó drásticamente en las 12 primeras horas, y continuó siendo muy alta a las 24 horas y disminuyendo a las 48 horas (Fig. 29A, 29B). Cuando se añadió neurostatina, además de EGF, la inactivación de Rb fue mucho menor, observándose una inhibición significativa de 3,9 veces a las 12 horas, que se mantuvo hasta las 24 horas, observándose niveles muy bajos de Rb fosforilada en este residuo a las 48 horas (Fig. 29A, 29B).

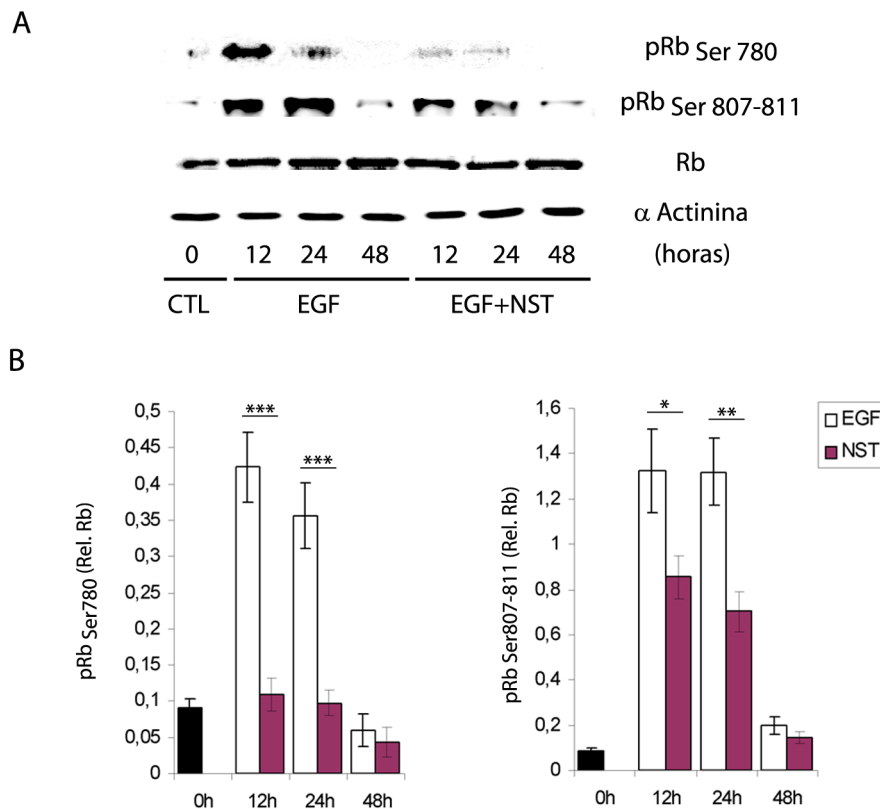


Figura 29. El tratamiento con neurostatina reduce la fosforilación de Rb.

(A, B) Evaluación mediante western blotting de la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb) en células U373MG en respuesta a DMEM (control negativo; CTL; barras negras), EGF (control positivo; barras blancas) o EGF+neurostatina (NST; O-Ac GD1b; barras púrpura). Se evaluó la fosforilación de Rb en los residuos Ser₇₈₀ y Ser₈₀₇₋₈₁₁, en relación con el total de proteína Rb expresada. La fosforilación de Rb fue evaluada entre las 0 y las 48 horas de tratamiento. (B) Cuantificación de la activación de Rb en los diferentes residuos, medida como cantidad de Rb fosforilado en cada residuo respecto a la cantidad de Rb total, empleando α-actinina como gen de expresión constante (housekeeping gene). Los datos se expresan como media±SD de la densidad óptica de pRb/Rb total (n=3). Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

La fosforilación de Rb en los residuos Ser₈₀₇₋₈₁₁ aumentó tras el tratamiento con EGF (Fig. 29A). La inactivación de Rb se mantuvo hasta las 24 horas tras la adición del mitógeno, para luego descender (Fig. 29B). El tratamiento con EGF y neurostatina disminuyó la fosforilación de Rb en los residuos Ser₈₀₇ y Ser₈₁₁, sobre todo tras las primeras 24 horas (Fig. 29A, 29B). De esta forma, la inactivación de Rb se redujo 1,5 veces en las primeras 12 horas y llegó a inhibirse 1,9 veces a los 30 minutos, observándose niveles muy bajos de Rb fosforilada en estos dos residuos a las 48 horas (Fig. 29B).

El tratamiento de células tumorales de astrocitoma humano U373MG con el gangliósido neurostatina (O-AC GD1b) inhibió la fosforilación de la proteína de retinoblastoma, evaluada mediante el estudio de los residuos de Ser₇₈₀, Ser₈₀₇ y Ser₈₁₁, impidiendo así la liberación del factor de transcripción E2F, responsable de la progresión del ciclo celular. Esto es una consecuencia directa de los efectos provocados por la neurostatina sobre los reguladores del ciclo celular estudiados anteriormente, implicados en la transición G₁-S.

3.2. Efecto de la neurostatina sobre la activación del receptor de EGF y la vía de señalización de las MAPKs

Para conocer cómo afecta el gangliósido neurostatina a la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y a la vía de señalización acoplada de las MAPKs se estudio la fosforilación tanto de EGFR (Fig. 30), como de la proteína acopladora Shc y de las MAP quinasas ERK 1 y ERK 2 (Fig. 31) mediante western blotting en células de la línea de astrocitoma humano U373MG. Para ello, las células fueron previamente mantenidas 36 horas sin suero y tratadas posteriormente con DMEM solo o con 2μM neurostatina, dosis correspondiente a la ID₅₀ para esta línea tumoral. Al cabo de una hora se añadió el mitógeno EGF (10 ng/ml) al medio y se incubaron las células a diferentes tiempos, obteniéndose las muestras a los 5, 15 y 30 minutos de incubación con EGF y 5, 15 y 30 minutos de incubación con EGF y pretratamiento con neurostatina. Como control negativo de activación de las vías en estudio se usaron células sin tratamiento con EGF ni preincubación con neurostatina (tiempo 0).

3.2.1. La neurostatina inhibe la activación del receptor de EGF (EGFR)

La activación de EGFR se analizó observando la fosforilación de tres residuos del receptor, correspondientes a las tirosinas (Tyr) 1068, 1045 y 992 (Fig. 30A, 30B). Mientras que la cantidad de EGFR se mantuvo constante en los diferentes tiempos con los distintos tratamientos, su grado de fosforilación varió. La activación del receptor de EGF se representó como fosforilación del receptor respecto a la cantidad de receptor sin fosforilar (Fig. 30B), variando este parámetro al tratar las células con EGF y neurostatina.

Las células control (t=0) presentaron una fosforilación mínima de los tres residuos estudiados de EGFR. Al añadir EGF a las células, la fosforilación del residuo Tyr₁₀₆₈ de EGFR aumentó con el tiempo hasta los 15 minutos, momento en el que la activación del receptor

fue máxima, descendiendo tras 30 minutos (Fig. 30A, 30B). El tratamiento de las células con neurostatina, de una manera suplementaria al EGF, produjo una menor activación del receptor a los tres tiempos estudiados, observándose una inhibición significativa de la fosforilación a partir de los 15 minutos, reduciéndose la activación de receptor provocada por la fosforilación de este residuo hasta 2,8 veces a los 30 minutos (Fig. 30A, 30B). De manera similar, la fosforilación del residuo Tyr₁₀₄₅ de EGFR aumentó al añadir EGF a las células. Éste aumento fue máximo a los 5 minutos y disminuyó levemente con el tiempo (Fig. 30A, 30B). El tratamiento con EGF y neurostatina disminuyó la fosforilación del residuo Tyr 1045 a los tres tiempos estudiados, de forma que la activación del receptor se redujo 1,4

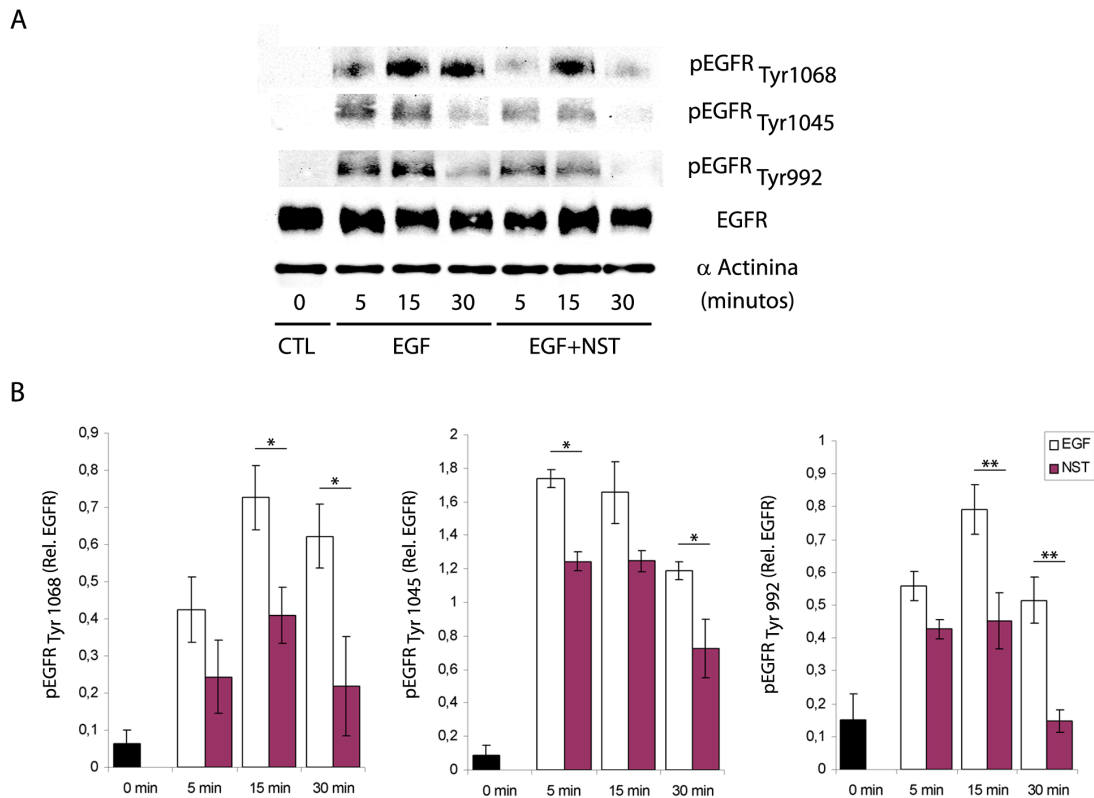


Figura 30. La neurostatina reduce la activación del receptor de EGF (EGFR).

(**A**, **B**) Evaluación mediante western blotting de la fosforilación del receptor de EGF (EGFR) en células U373MG en respuesta a DMEM (control negativo; CTL; barras negras), EGF (control positivo; barras blancas) o EGF+neurostatina (NST; O-Ac GD1b; barras púrpura). Se evaluó la fosforilación de EGFR en los residuos Tyr₁₀₆₈, Tyr₁₀₄₅ y Tyr₉₉₂, en relación con el total de proteína EGFR expresada. La fosforilación de EGFR fue evaluada entre los 0 y los 30 minutos de tratamiento. (**B**) Cuantificación de la activación de EGFR en los diferentes residuos, medida como cantidad de EGFR fosforilado en cada residuo respecto a la cantidad de EGFR total, empleando α-actinina como gen de expresión constante (housekeeping gene). Los datos se expresan como media±SD de la densidad óptica de pEGFR/EGFR total (n=3). Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

veces en los primeros 5 minutos y llegó a inhibirse un 1,6 veces a los 30 minutos (Fig. 30A, 30B). La fosforilación de residuo Tyr₉₉₂ aumento en el tiempo al tratar las células con EGF, siendo máxima a los 15 minutos (Fig. 30A, 30B). La neurostatina resultó efectiva en la reducción de su fosforilación, observándose una significativa inhibición de la activación del receptor de los 15 a los 30 minutos, que llegó a ser 3,5 veces menor con respecto al tratamiento único con EGF a los 30 minutos (Fig. 30A, 30B).

Los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento de células de la línea tumoral de astrocitoma humano U373MG con el gangliósido neurostatina (O-AC GD1b) inhibió la activación del receptor de EGF, evaluada por la fosforilación de los residuos de Tyr₁₀₆₈, Tyr₁₀₄₅ y Tyr₉₉₂.

3.2.2. La neurostatina inhibe la activación de Shc y ERK 1 y ERK 2

Una vez constatada la disminución de la activación del receptor de EGF por el tratamiento de las células tumorales con neurostatina (Fig. 30), estudiamos los efectos de esta inhibición sobre la activación de la vía de las MAPKs (Fig. 31). Para ello evaluamos la activación de la proteína acopladora Shc y de las quinasas ERK 1 y ERK 2.

La activación de la proteína acopladora Shc se calculó como la cantidad de proteína fosforilada con respecto a la cantidad total de proteína Shc (Fig. 31B). El tratamiento de las células con el mitógeno EGF provocó que la fosforilación de la proteína Shc aumentara rápidamente con respecto al control (t=0; Fig. 31A, 31B)). La máxima activación fue observada a los 5 minutos y aunque con el tiempo va disminuyendo, a los 30 minutos aún continuó fosforilada una proporción elevada de Shc (Fig. 31B). Cuando, además de tratar con EGF, se pre-trató con neurostatina, la cantidad de proteína activada disminuyó drásticamente. A los cinco minutos la activación de la proteína acopladora Shc se redujo alcanzando los valores del control (2 veces respecto a EGF) y siguió disminuyendo con el tiempo, llegando a reducirse en 12,5 veces a los 30 minutos, respecto a tratamiento con EGF (Fig. 31A, 31B).

Por otra parte, se estudió el efecto de la neurostatina sobre la activación de las MAP quinasas ERK 1 y ERK 2. La fosforilación de ERK 1 se vio aumentada al tratar con EGF (Fig. 31A). La activación de esta proteína, nuevamente calculada como la proporción de proteína fosforilada respecto a la total, fue incrementándose exponencialmente hasta los 30 minutos (Fig. 31B). El tratamiento combinado de EGF con neurostatina provocó una inhibición de la fosforilación de ésta quinasa altamente significativa a los tres tiempos estudiados, llegando a reducirse 4,4 veces a los 5 minutos, 2,5 veces a los 15 minutos y 2 veces a los 30 minutos (Fig. 31A, 31B). La fosforilación de ERK 2 aumentó a los 15 y 30 minutos del tratamiento con EGF y la neurostatina redujo la activación provocada por el mitógeno, siendo esta reducción significativa a los 30 minutos (Fig. 31A, 31B).

El tratamiento de células de la línea tumoral de astrocitoma humano U373MG con el gangliósido neurostatina (O-AC GD1b) inhibió la activación tanto de la proteína acopladora Shc, cómo de las quinasas ERK 1 y ERK 2, inhibiéndose la vía de las MAPKs activada por EGFR.

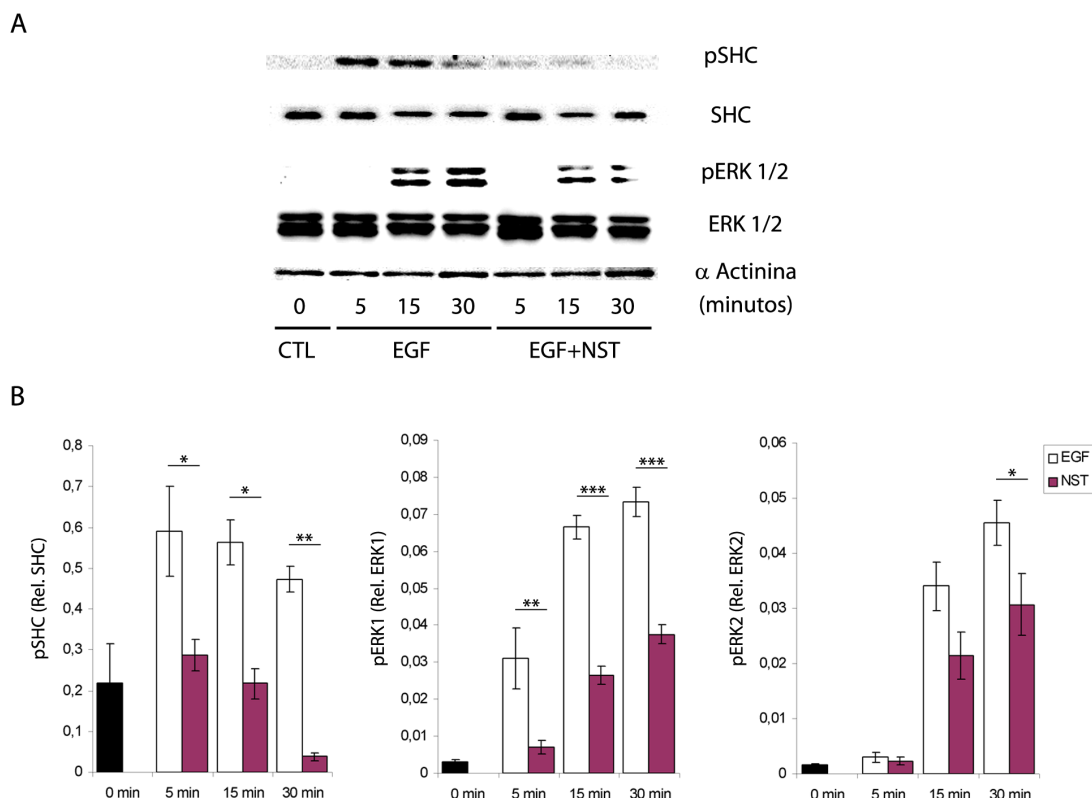


Figura 31. La neurostatina reduce la activación de la vía de las MAPKs.

(**A, B**) Evaluación mediante western blotting de la fosforilación de la proteína adaptadora Shc y de las MAPKs ERK1 y ERK2 en células U373MG en respuesta a DMEM (control negativo; CTL; barras negras), EGF (control positivo; barras blancas) o EGF+neurostatina (NST; O-Ac GD1b; barras púrpura). Se evaluó la activación de Shc (pShc) y ERK1/2 (pERK1/2) en relación con el total de proteína expresada. La fosforilación de Shc y ERK1/2 fue evaluada entre los 0 y los 30 minutos de tratamiento. (**B**) Cuantificación de la fosforilación de Shc y ERK1/2, empleando α -actinina como gen de expresión constante (housekeeping gene). Los datos se expresan como media \pm SD de la densidad óptica de pShc/Shc total o pERK1/2/ERK1/2 total (n=3). Significación estadística: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey.

3.3. Efecto de la neurostatina sobre la expresión génica de los reguladores de la biología tumoral

Los resultados obtenidos anteriormente indicaron que la neurostatina es capaz de bloquear la activación del receptor de EGF (EGFR; Fig. 31), evidenciada mediante un cambio en su fosforilación. Como consecuencia directa, se redujo la activación de la vía de las MAPK ERK, observándose un descenso en la fosforilación de la proteína adaptadora Shc y de las proteínas ERK 1 y ERK 2 (Fig. 31). La inhibición de esta vía de señalización bloquearía la proliferación inducida por el mitógeno, actuando sobre las proteínas reguladoras de la transición G1-S, produciéndose la parada del ciclo celular en la fase G₁. La alteración de esta vía de señalización en respuesta a la neurostatina podría significar solo una parte de los efectos del gangliósido sobre la célula tumoral. De este modo, procedimos a evaluar la

expresión génica de los factores más importantes que regulan los procesos más relevantes de la biología tumoral (Fig. 32; Tabla S2). La expresión de ARNm fue evaluada mediante el uso de arrays de PCR (PCR arrays, Cancer Pathway Finder) y el análisis agrupado de los resultados (Fig. 32; Tabla S2). Los genes estudiados se correspondieron a funciones como el control del ciclo celular, apoptosis y senescencia, moléculas de transducción de señales y factores de transcripción, adhesión, angiogénesis e invasión y metástasis. Se compararon muestras de células U373MG tratadas con EGF con muestras de células tratadas con EGF y neurostatina, tras 24 horas.

Los resultados obtenidos fueron agrupados en función de las diferentes funciones analizadas. De este modo, en el análisis de la expresión génica de las proteínas implicadas en el control del ciclo celular (Fig. 32A) se observó que la neurostatina provoca una reducción significativa en la expresión de los genes de la ciclina E1 (CCNE1), CDC25A y CDK2, todos ellos necesarios para la progresión del ciclo celular. Los inhibidores de los complejos ciclina-CDK, p16 (CDKN2A) y p21 (CDKN1A) se vieron significativamente sobre-expresados con el tratamiento con neurostatina (Fig. 32A). Consecuentemente, se observó una reducción significativa en la expresión de Retinoblastoma 1 (RB1; Fig. 32A)). El tratamiento con neurostatina redujo significativamente la expresión del factor de transcripción E2F1, regulado por la actividad de la proteína Rb (Fig. 32A). También se observó una disminución significativa de la expresión de la proteína ATM, así como la sobre-expresión de la proteína S100A4 (Fig. 32A). Todo esto conlleva a una regulación del ciclo celular, que impediría a las células seguir dividiéndose incontroladamente.

El análisis de la expresión génica de las proteínas implicadas en la apoptosis y la senescencia celular aportó los siguientes resultados (Fig. 32B). El tratamiento con neurostatina provocó la sobre-expresión significativa de genes pro-apoptóticos, como BAD, granzima A (GZMA) o HTATIP2, y la reducción significativa de la expresión de BCL2L1, proteína anti-apoptótica (Fig. 32B).

El tratamiento con neurostatina también alteró la expresión de mediadores de las principales vías de transducción de señales reguladas por EGF (Fig. 32C). Así, la neurostatina provocó una reducción significativa de la expresión de genes de respuesta temprana, como C-FOS o C-MYC (Fig. 32C). También se redujo significativamente la expresión de proteínas implicadas en la vía de las MAPK, como RAF1, o en la vía de la PI3K, como AKT1 o PIK3R1 (Fig. 32C). El tratamiento con neurostatina también produjo la sobre-expresión del inhibidor de la vía de NFκB, NFKBIA (Fig. 32C).

Analizando los resultados correspondientes a la regulación de la adhesión celular (Fig. 32D), se pudo observar como la neurostatina produjo la sobre-expresión de la integrina B3 (ITGB3), del supresor de metástasis 1 (MTSS1) y de la tirosina quinasa de bazo (SYK). Paralelamente, produjo una reducción en la expresión de la pinina (PNN).

La expresión génica de los factores reguladores de la angiogénesis también se vio alterada por el tratamiento con neurostatina (Fig. 32E). Se produjo una sobre-expresión significativa del factor de necrosis tumoral (TNF; Fig. 32E). Neurostatina redujo significativamente la expresión de factores tróficos como la angiopoietina 2 (ANGPY2), del

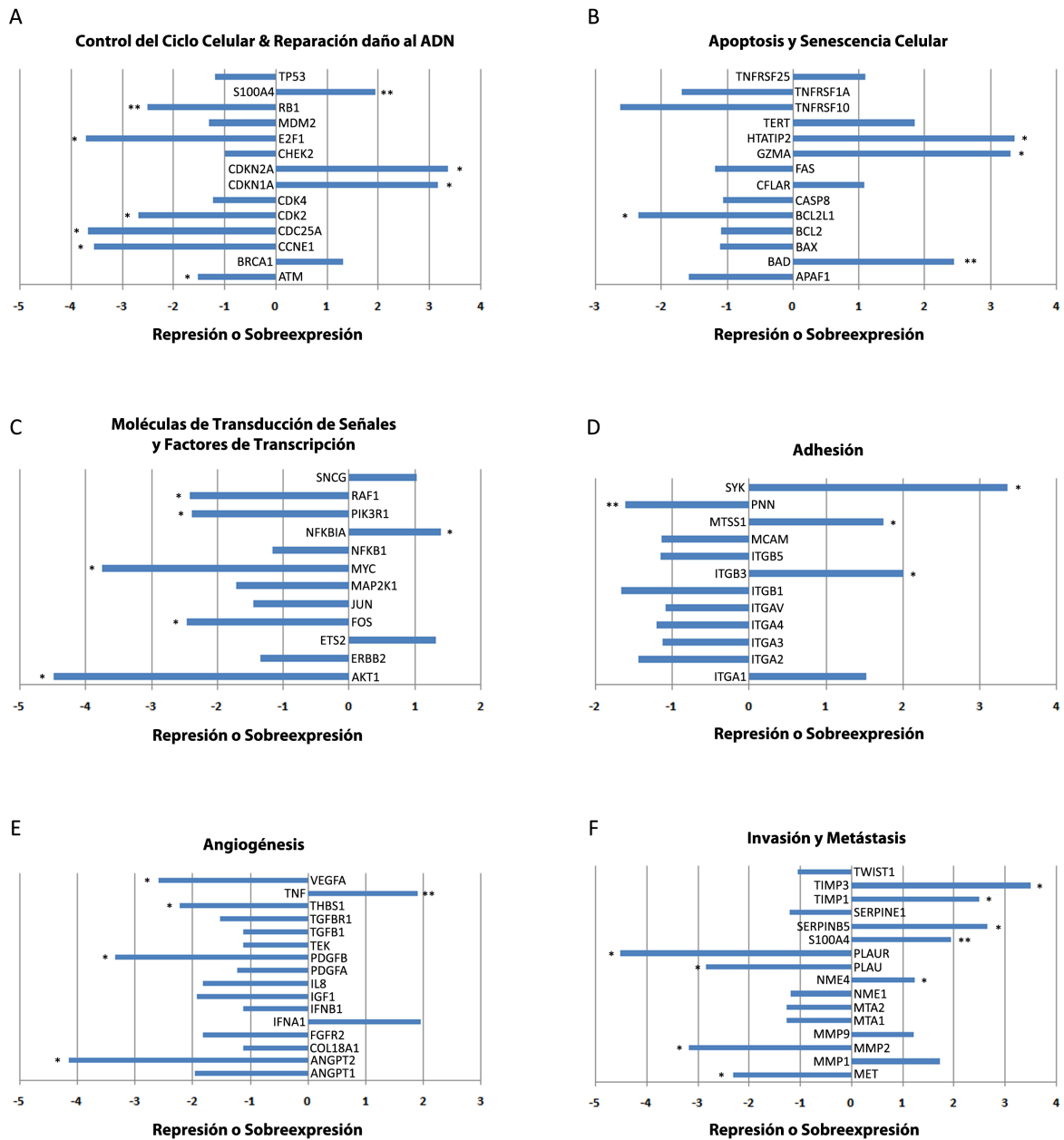


Figura 32. Efecto de la neurostatina sobre la expresión génica de moléculas implicadas en procesos tumorales.

(A-F) Análisis de la expresión de RNAm mediante arrays de PCR en células U373MG tratadas con EGF o con EGF+neurostatina. La expresión génica fue evaluada a las 24h de tratamiento. La expresión génica en las muestras de EGF+neurostatina fue relativizada a la de las muestras con EGF, expresando los resultados como grado de represión o sobreexpresión relativa. Los genes fueron agrupados en seis categorías funcionales: Control del Ciclo Celular y Reparación del daño al ADN (A), Apoptosis y Senescencia Celular (B), Moléculas de Transducción de Señales y Factores de Transcripción (C), Adhesión (D), Angiogenesis (E) e Invasión y Metástasis (F). Significación estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

factor de crecimiento de plaquetas (PDGFB) o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFA). También se produjo una reducción significativa en la expresión de la tromboespondina 1 (THBS1), en respuesta al tratamiento con neurostatina (Fig. 32E).

Por último, se analizó la expresión génica de los factores implicados en los procesos de invasión y metástasis tumoral (Fig. 32F). El tratamiento con neurostatina redujo significativamente la expresión de la proteína activadora de plasminógeno (PLAU) y de su receptor (PLAUR). También se redujo la expresión de la metaloproteinasa de matriz extracelular 2 (MMP2) y del proto-oncogen Met (MET). Paralelamente, la neurostatina indujo la sobre-expresión de los inhibidores de metaloproteinasas TIMP1 y TIMP3 (Fig. 32F). También se aumentó significativamente la expresión del inhibidor de la peptidasa serpina (SERPINB5) y de S100B, como se mostró anteriormente. La neurostatina también aumentó la expresión de la proteína expresada en células no-metastáticas (NME4; Fig. 32F).

El análisis de los resultados obtenidos mediante la evaluación de la expresión génica por arrays de PCR (Fig. 32) nos indica, de manera global, que la reducción de la señalización de las vías activadas por EGF provocada por la neurostatina tiene consecuencias directas sobre la regulación de procesos fundamentales para el crecimiento, migración y diferenciación de las células tumorales en el sistema nervioso central, abriendo a su vez nuevas vías de estudio sobre posibles dianas moleculares adicionales del gangliósido.

DISCUSIÓN

1. SÍNTESIS DE NEUROSTATINA Y SUS DERIVADOS: RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN

La importancia de la neurostatina radica en que, además de ser un inhibidor natural de la proliferación de astrocitos, es un potente inhibidor de la proliferación de células de glioma murino y humano, lo que conduce a su posible aplicación clínica en la terapia anti-tumoral. El problema fundamental que impide la traslación de estas propiedades a los sistemas experimentales *in-vivo* es la falta de disponibilidad del gangliósido, ya que la concentración de neurostatina en el cerebro adulto es muy baja y además su expresión disminuye, al igual que la de todos los gangliósidos de la serie b, cuando se desarrolla un glioma en el SNC. En este trabajo, empleando una técnica de O-acetilación química de GD1b se ha obtenido el gangliósido neurostatina, identificado por su movilidad en cromatografía en capa fina y su análisis por espectrometría de masas y electrospray-MS.

Los estudios previos realizados sobre la acetilación química de gangliósidos (Hubl y cols., 2000; Romero-Ramírez y Nieto-Sampedro, 2004) muestran que la acetilación se produce regioselectivamente en el hidroxilo en posición 9 del ácido siálico, siendo esta posibilidad apoyada por la literatura sobre gangliósidos de la serie "b" (Sjöberg y cols., 1992; Hitoshi y cols., 1996). Para que se produzca la O-acetilación del ácido siálico terminal de GD1b es necesario hacerlo reaccionar con un donador de grupos acetilo como es el TMOA, en presencia de concentraciones catalíticas de ácido p-toluenosulfónico. La acetilación del ácido siálico terminal de GD1b conlleva una dificultad añadida respecto a otros gangliósidos más sencillos, al poseer dos ácidos siálicos con posibles lugares de acetilación, además de los azúcares. Para obtener específicamente la especie mono-sustituída, y por tanto neurostatina, a partir de GD1b, hay que usar condiciones de reacción restrictivas (ej. reducción de la concentración del sustituyente, del tiempo de reacción o de la temperatura de reacción), con el fin de limitar las sustituciones secuenciales en la misma molécula. Las condiciones de reacción son específicas para cada gangliósido, y varían en función del número de ácidos siálicos que éste posea (Hubl y cols., 2000). Por ejemplo, el gangliósido GT1b, que posee tres ácidos siálicos en su estructura, necesita menor cantidad de donador de acetilos (TMOA) y menor tiempo de reacción que GD1b para obtener un producto mono-sustituído (datos no mostrados). Otro factor importante que influye en la O-acetilación es la temperatura. En el presente trabajo hemos observado que el rendimiento de obtención de neurostatina aumenta a una temperatura de reacción media de 18°C y que al elevar la temperatura unos pocos grados (21-25°C) se produce una mayor proporción de especies varias veces acetiladas, obteniéndose Bi-O-Ac GD1b, con una acetilación en cada siálico, Tri-O-Ac GD1b y Tetra-O-Ac GD1b, con una y dos acetilaciones en la cadena de azúcares, respectivamente.

La inserción del grupo acetilo en la estructura de los gangliósidos provoca un cambio en la molécula que le confiere características especiales como son la disminución de la polaridad, y lo que puede ser más importante, una actividad anti-proliferativa muy fuerte (Romero-Ramírez y Nieto-Sampedro, 2004). El gangliósido parental GD1b no posee ningún efecto inhibitorio sobre las líneas de astrocitoma humano U373MG y de glioblastoma de rata

C6 a concentraciones de 50 μ M. En cambio, la introducción del O-acetilo en el ácido siálico terminal de GD1b (neurostatina sintética), produce una fuerte inhibición de la división de células tumorales, similar a la producida por la neurostatina natural existente en el sistema nervioso, con una ID₅₀ del orden de 2 μ M en la línea de astrocitoma humano U373 y de 0,2 μ M en la línea de glioblastoma de rata C6, en presencia de EGF como mitógeno. La O-acetilación de los ácidos siálicos modifica las propiedades de los gangliósidos, haciéndolos más resistentes a la acción de las siáldasas (Corfield y cols., 1986) y alterando su reconocimiento por lectinas y anticuerpos monoclonales (Cheresh y cols., 1984; Sjöberg y cols., 1994), respecto a los gangliósidos sin acetilar. Por lo tanto, la O-acetilación del siálico terminal de GD1b estaría provocando un cambio en la estructura del gangliósido que causa, por una parte, que la neurostatina reconozca su diana o que cambie su afinidad por la misma, inhibiendo la proliferación de las líneas de glioma y, por otra parte, que la neurostatina sea más resistente a la acción de ciertas enzimas, aumentándose su vida media y por tanto su tiempo de acción en las membranas celulares.

El cambio funcional ocasionado por la acetilación podría llevar a pensar, *a priori*, que especies de GD1b con un mayor número de acetilaciones podrían ser más inhibitorias. Sin embargo, nuestros resultados indican que la actividad inhibitoria no aumenta al incrementar el número de O-acetilaciones introducidas en GD1b. Esto podría ser debido a que la O-acetilación del ácido siálico terminal es la que determina las nuevas propiedades del gangliósido. Al introducir la primera O-acetilación en GD1b se estaría produciendo un cambio conformacional en la molécula que determina el cambio en las propiedades físico químicas del gangliósido y por consiguiente, el cambio en su actividad. Una vez producido este cambio conformacional la adición de O-acetilaciones adicionales no influiría significativamente en una mejora de la actividad del gangliósido frente a las células tumorales. En esta dirección, estudios preliminares de modelización de las estructuras de los gangliósidos sintetizados indican que la O-acetilación del ácido siálico terminal provoca un cambio conformacional en la estructura, que favorecería la interacción con las dianas sobre las que actúa. Los estudios de la dinámica molecular de los compuestos indican que la neurostatina es mucho más flexible que GD1b (Fig. 33A, 33B), adoptando, por tanto, más conformaciones en solución acuosa. Una de las posibles explicaciones de este brusco cambio conformacional es la creación de puentes de hidrógeno en la estructura de la neurostatina, aspecto que está siendo estudiado en la actualidad. Por el contrario, el derivado butirado (O-But GD1b), aunque también sufre un fuerte cambio conformacional en comparación tanto con GD1b como con el compuesto acetilado (Fig. 33C), adquiere una conformación más rígida que la neurostatina. En el reconocimiento de las posibles dianas moleculares de la neurostatina determinantes de su actividad, participan tanto la estructura galactosil-N-acetil-galactosaminil (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc), como los dos ácidos siálicos consecutivos y el terminal acetilado (O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac) de la neurostatina (Romero-Ramírez y Nieto-Sampedro, 2004). El gangliósido GD1b también posee la estructura Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc pero, sin embargo, no es inhibitorio. La O-acetilación del ácido siálico terminal de GD1b conlleva el cambio conformacional en la estructura, que hace que el acetilo presente, junto con la cola

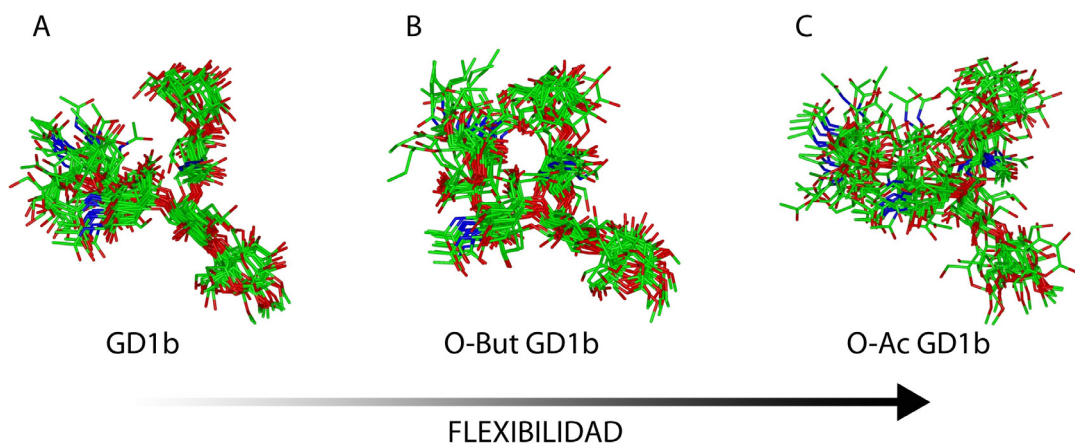


Figura 33. Simulación de las conformaciones adoptadas por los gangliósidos GD1b, O-But GD1b y neurostatina.

Representación de las conformaciones adoptadas por los gangliósidos GD1b (A) O-But GD1b (B) y O-Ac GD1b o neurostatina (C) en disolución acuosa. La flecha indica el aumento en flexibilidad de las estructuras de los gangliósidos.

de azúcares (Fig. 33B), sean responsables del reconocimiento de las dianas que hacen al gangliósido inhibidor de la proliferación tumoral. Adicionalmente, el hecho de que anticuerpos monoclonales contra un gangliósido no reconozcan el gangliósido O-acetilado en el siálico terminal, y que anticuerpos monoclonales contra gangliósidos O-acetilados en el ácido siálico terminal no reconozcan gangliósidos O-acetilados en un lugar diferente de la estructura específicamente (Ritter y cols., 1990), indica que el gangliósido al O-acetilarse en el ácido siálico terminal sufre una modificación conformacional importante que le lleva a ser un determinante antigénico reconocido. El hecho de que la O-acetilación sea fundamental para la actividad de la neurostatina, hace que la mejora y estabilización de este sustituyente suponga una potencial ventaja a la hora de incrementar su actividad. En el presente trabajo se postuló que la inserción de un sustituyente con cadena alifática más larga que el acetilo, como es el radical butirilo, podría incrementar la estabilidad del enlace. Los resultados obtenidos indican que la O-butilación del ácido siálico terminal de GD1b mejora la actividad anti-proliferativa de la neurostatina. En particular, en las células de astrocitoma humano U373MG, O-but GD1b es 2,3 veces más inhibitorio que la neurostatina, en presencia del mitógeno EGF. La inserción de múltiples O-butilaciones tampoco mejora la actividad del gangliósido mono-butilado sobre las líneas de glioma probadas, apoyando la idea de que la primera O-sustitución provoca un cambio conformacional responsable del aumento en la actividad. La sustitución de un grupo acetilo por un grupo butirilo, en el ácido siálico terminal de GD1b, podría conferir al nuevo compuesto mayor estabilidad. En este sentido, hemos observado como el compuesto butirilado presenta una mayor resistencia a la hidrólisis alcalina, hidrolizándose más lentamente y en menor proporción que la neurostatina. Esto indica que los gangliósidos O-butilados son más resistentes a la hidrólisis que los gangliósidos O-acetilados, siendo probablemente la cadena carboxílica más larga la

que otorga una mayor protección del enlace $\alpha(2-8)$ entre los ácidos siálicos frente a sialidasas. Los estudios sobre las dinámicas moleculares de los compuestos podrían explicar también las diferencias en estabilidad (Fig. 33). La mayor flexibilidad de la neurostatina, en comparación con O-But GD1b, permitiría que el centro activo de enzimas degradativas se acomode mejor al gangliósido, interacción que se vería más dificultada en el caso de O-But GD1b al ser más rígido. Sin embargo, sería necesario conocer la conformación de ambas moléculas en el estado asociado para poder aseverar estas propiedades. En la práctica, hemos sintetizado un compuesto, el O-But GD1b, que presenta mayor actividad anti-proliferativa que la neurostatina, y que además es más estable a la hidrólisis, lo que se traduce en un potencial aumento de su tiempo de acción en las membranas (microdominios) y en los espacios extracelulares, tanto en sistemas *in-vitro* de cultivos celulares, como en un organismo vivo.

Los resultados presentados en este trabajo indican que los gangliósidos sintetizados tienen una actividad antitumoral 10 veces mayor sobre células C6 de glioma de rata que sobre células de astrocitoma humano U373MG. La mayor actividad inhibitoria de los gangliósidos modificados sobre la línea glioblastoma de rata C6 puede deberse a que la diana sobre la que actúan la neurostatina y O-but GD1b tenga una relevancia diferencial para la proliferación de ambas líneas. En este sentido, una de las diferencias más destacables entre ambos tipos de líneas tumorales es la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). La línea de glioma de rata C6 presenta sobreexpresión de EGFR (Sibenaller y cols., 2005), mientras que las células U373MG tienen una expresión normal del receptor (Fan y Weiss, 2005). Esto explicaría una respuesta proliferativa diferencial al mitógeno EGF. De este modo, la regulación del sistema EGF-EGFR por parte de los gangliósidos surge como posible estrategia de inhibición de la proliferación.

La síntesis química de un inhibidor tumoral natural, como es la neurostatina, ofrece varias ventajas: en primer lugar, se trata de un compuesto existente en el sistema nervioso, lo que evitaría posibles reacciones adversas del tratamiento, suponiendo una ventaja ante un potencial uso terapéutico. En segundo lugar, el método descrito permite la obtención del compuesto a partir de GD1b de una manera más rápida y estandarizable que la purificación a partir de tejido cerebral, para así poder afrontar con medios técnicos suficientes la terapia antitumoral en modelos animales *in vivo*. Paralelamente, la síntesis química de un gangliósido como es GD1b O-butilado en su siálico terminal, análogo a la neurostatina pero con mayor actividad antitumoral que ésta, debido a su mayor estabilidad, supone una nueva herramienta para el estudio de la inhibición por gangliósidos de tumores en el SNC.

2. ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LA NEUROSTATINA Y O-BUT GD1b

Un aspecto destacable del efecto inhibitorio de la neurostatina y de O-But GD1b sobre la proliferación de células tumorales es que se produce a concentraciones muy bajas, en comparación con otros gangliósidos que inhiben células tumorales, y con otras drogas antitumorales que se emplean para el tratamiento de gliomas en clínica. En este sentido, el

gangliósido GM3 se ha descrito como un inhibidor del crecimiento de la línea de carcinoma epitelial humano A431, ejerciendo su acción a concentraciones mayores de 200 μ M (Hanai y cols., 1988;Rebbaa y cols., 1996). GM3 inhibe también distintas líneas derivadas de glioblastomas multiforme humanos, y lo hace a concentraciones cercanas a 100 μ M (Noll y cols., 2001). Por otra parte, la droga antitumoral de elección en el tratamiento de los glioblastomas, la temozolamida (TMZ) (Stevens y cols., 1987;Kanzawa y cols., 2003), inhibe la proliferación de las líneas de glioma estudiadas a una concentración 200 veces superior a la que actúa los gangliósidos sintetizados en este trabajo. La efectividad de los compuestos semi-sintéticos podría ser aún mayor si tenemos en cuenta que los gangliósidos añadidos exógenamente pueden encontrarse en solución formando micelas (Sonnino y cols., 1994), pudiendo actuar sobre la célula únicamente una fracción de ellos (Bremer y cols., 1984). Entre los compuestos sintetizados en este trabajo, donde todos presentan una elevada actividad antitumoral, cabe destacar la eficacia de los compuestos mono-sustituídos O-Ac GD1b (neurostatina) y O-But GD1b. El hecho de que estos dos compuestos tengan la actividad inhibitoria más elevada, sumado a que la neurostatina es un inhibidor natural en el SNC, y que O-But GD1b es un análogo de la neurostatina con mayor estabilidad, hacen de estos dos gangliósidos los candidatos de elección para el tratamiento de tumores *in-vivo*. Adicionalmente, y tal y como muestran los resultados, ni la neurostatina, ni O-But GD1b presentan toxicidad neuronal en un amplio rango de concentraciones, y ambos controlan la división de astrocitos sin causar muerte celular, lo que los hace adecuados para el tratamiento clínico de tumores cerebrales.

La actividad antitumoral *in-vivo* de la neurostatina y 9-O-But GD1b, evaluada en modelos experimentales de glioma, fue extremadamente específica, ya que las dosis empleadas para el tratamiento fueron muy bajas (20-40 μ g/Kg), en comparación con otros gangliósidos como GM3 (12mg/Kg intratumoral)(Noll y cols., 2001), y con otras drogas anti-tumorales como TMZ (15mg/Kg intraperitoneal)(Yamini y cols., 2007). Aunque ambos gangliósidos presentan una elevada efectividad, la actividad de la neurostatina es mejorada por la sustitución del radical acetilo por un butirilo (O-But GD1b), lo que aporta mayor estabilidad al gangliósido. En condiciones biológicas, como sucede en los xenotransplantes en ratones desnudos, la estabilidad del compuesto es crucial para mantener la actividad inhibitoria. Tanto en los transplantes de astrocitoma humano como de glioblastoma de rata, el tratamiento con neurostatina u O-But GD1b redujo el crecimiento tumoral un 40-50% respecto a los tratamientos control, observándose en ambos casos un efecto ligeramente superior del compuesto butirilado. Sin embargo, las diferencias entre O-Ac GD1b y O-But GD1b no fueron evidentes en los tratamientos de alotransplantes intracraneales de glioma, probablemente debido a la participación del sistema inmune en la respuesta, componente ausente en el modelo de xenotransplantes en ratones desnudos (Jacob y cols., 2004). En el modelo experimental de alotransplante, el glioma crece en el interior cerebral, no pudiéndose realizar un seguimiento del crecimiento del mismo sin acceso a técnicas de resonancia magnética. En nuestro caso, los resultados obtenidos a tiempo final (48 horas tras el tratamiento) nos muestran una instantánea del crecimiento tumoral. El crecimiento del

tumor se redujo por el tratamiento con bajas dosis de ambos gangliósidos (20µg/Kg), siendo más efectivo en el ambiente cerebral el gangliósido O-acetilado. La única referencia reportada en un modelo tumoral *in-vivo* en relación a la neurostatina se basa en el estudio del efecto del oligosacárido sintético relacionado TS4 (Nieto-Sampedro y cols., 1996). TS4 es efectivo *in vitro* a dosis más altas que la neurostatina (35mM)(Santos-Benito y cols., 1992) e, *in vivo*, induce muerte celular por necrosis de tumores intracraneales (Nieto-Sampedro y cols., 1996). Las observaciones contenidas en estos estudios sobre la dosis efectiva y el modo de acción de TS4 no concuerdan con los efectos citostáticos reportados para la neurostatina (Abad-Rodriguez y cols., 1998), ni con los resultados obtenidos en este trabajo. Esta falta de concordancia en la acción biológica de ambos compuestos podría deberse a sus diferencias estructurales, ya que el oligosacarido TS4 fue diseñado mimetizando exclusivamente la fracción glicídica de la neurostatina (Santos-Benito y cols., 1992). Sin embargo, estudios posteriores describieron que la actividad inhibitoria de la neurostatina radica en la O-acetilación del ácido siálico terminal y en la cola galactosil-N-acetil galactosaminil (Romero-Ramirez y Nieto-Sampedro, 2004).

La reducción del crecimiento de los gliomas intracraneales desarrollados en animales mediante el tratamiento con neurostatina u O-But GD1b se correlaciona con la inhibición de la división de las células tumorales *in vitro*, al disminuirse el número de células que entran en mitosis (células pHH3+). Paralelamente, se observó como a las 48 horas del tratamiento ya aparecen células tumorales apoptóticas (caspasa-3+), cuyo número probablemente se vea incrementado a tiempos más largos. La tasa de apoptosis es mayor en los tumores tratados con neurostatina que en los tratados con el compuesto butirilado, pudiendo ser la causa de la mayor reducción en el volumen tumoral observada en los tumores tratados con el compuesto acetilado.

Una de las ventajas de la comparación de los dos modelos experimentales *in-vivo* empleados en este trabajo es la posibilidad de estudiar cómo afectan los tratamientos al crecimiento tumoral en relación con el sistema inmune. En los tumores intracraneales tratados con los gangliósidos se observó un incremento en la infiltración de células inmunes (macrófagos y linfocitos) al interior del parénquima tumoral. La presencia de células inmunes en el interior de los gliomas está ampliamente documentada, pero su actividad anti-tumoral es motivo de gran controversia (Parney y cols., 2000; Hussain y cols., 2006). Los gliomas malignos, como mecanismo de protección, elaboran una respuesta inmunosupresora, produciendo factor de crecimiento transformante b (TGFB), e interleuquina 10 (IL10), que actúan reduciendo la actividad de los linfocitos T (Zou y cols., 1999). Además, la respuesta anti-tumoral de los linfocitos T solo puede ser completada con la presencia de células presentadoras de antígeno (APC) que permitan la respuesta frente a antígenos tumorales, función que en el SNC normalmente lleva a cabo la microglía activada o los macrófagos y que se ve inhibida durante el crecimiento tumoral (Graeber y cols., 2002; Watters y cols., 2005). Sin embargo, ante la aparición de muerte celular tumoral se reactiva la respuesta inmune, debido a la disminución del ambiente inmunosupresor (Curtin y cols., 2005). Los resultados del análisis de la expresión génica *in-vitro* de células U373MG muestran que la

neurostatina produce la reducción de la expresión de NFκB1 y la sobre-expresión de su inhibidor, NFκBIA. El sistema de NFκB regula la expresión de diversos mediadores inflamatorios, que en la célula tumoral podrían estar colaborando en el control la respuesta inmune, como parte de los mecanismos de evasión (Siebenlist y cols., 1994). La relación entre la neurostatina y la respuesta inmune se ha estudiado en diferentes modelos de activación inflamatoria después de un daño en el SNC, mostrando un papel en la regulación de las respuestas dependientes de interleuquina 15 (IL-15), inhibiendo la respuesta de NFκB (Gomez-Nicola y cols., 2008; Gomez-Nicola y cols., 2009). La regulación del sistema de NFκB ha sido también descrita para el gangliósido GD1b sobre células T (Irani y cols., 1996). Sin embargo, pese a que los resultados de este trabajo muestran un claro efecto sobre el reclutamiento de células inmunes, no permiten discriminar si los compuestos ejercen un efecto directo o indirecto, al causar la pérdida de la inmunosupresión causada por los gliomas, lo que deberá ser estudiado en trabajos futuros.

Al efecto de los gangliósidos semi-sintéticos sobre el crecimiento tumoral *in vivo* podría sumarse un potencial efecto anti-angiogénico. Los gliomas se caracterizan por presentar una potente actividad angiogénica (Tate y Aghi, 2009), y nuestros resultados indican que la neurostatina es capaz de inhibir la expresión de moléculas clave para esa respuesta. En células U373MG, la neurostatina reprime la expresión de VEGFA y PDGFB, factores responsables de la neovascularización y dianas de múltiples aproximaciones terapéuticas (Fleming y cols., 1992; Zhou y cols., 2003; Miletic y cols., 2009). La neurostatina también inhibe la expresión de la angiopoietina-2 (ANGPT2), molécula pro-angiogénica y promotora de la invasividad tumoral (Lauren y cols., 1998; Hu y cols., 2006). Estos resultados apuntan a un potente efecto de la neurostatina sobre la inhibición de la angiogénesis, que podría suplementar su actividad anti-proliferativa para inhibir globalmente el crecimiento tumoral.

El crecimiento de los gliomas se caracteriza por un elevado grado de invasividad, que permite la rápida extensión en el sistema nervioso (Tate y Aghi, 2009). El estudio de la expresión génica de células de astrocitoma humano U373MG nos permitió estudiar el efecto de la neurostatina sobre las moléculas reguladoras de los procesos de invasión y metástasis. La neurostatina reduce la expresión del gen de la metaloproteinasa de tejido 2 (MMP2) e induce la sobre-expresión de sus inhibidores, TIMP1 y TIMP3. MMP2, también conocida como gelatinasa A, es una molécula clave en la biología de los gliomas, correlacionándose con la invasividad celular de varias líneas de glioma y siendo utilizado como predictor de invasividad en pacientes con glioma (Sawaya y cols., 1996; Lampert y cols., 1998; Wild-Bode y cols., 2001). El sistema del activador de plasminógeno y su receptor (PLAU/PLAUR) también se ve inhibido por el tratamiento con neurostatina. Este sistema es de relevante importancia en la disolución de la matriz extracelular necesaria para la migración de las células de glioma durante los procesos de invasión, siendo el bloqueo de su actividad efectiva para la inhibición de la invasividad tumoral (Sitrin y cols., 1990; Mohanam y cols., 1994; Mohanam y cols., 1997). Complementariamente, la neurostatina induce la sobre-expresión del inhibidor del activador de plasminógeno (SERPINB5), factor considerado como supresor tumoral (Reich y cols., 1988). Durante la migración de las células de glioma, factores como el factor de

crecimiento de hepatocitos (HGF) controlan la motilidad celular, estimulando a su vez la producción de metaloproteinasas (Moriyama y cols., 1996). Nuestros resultados indican que la neurostatina inhibe la expresión de MET (receptor de HGF), en las células U373MG. Considerados en conjunto, estos resultados indican que la neurostatina podría ser un potente regulador de la invasividad tumoral, como parte de su acción inhibitoria *in vivo*.

La actividad *in vivo* de la neurostatina y de O-But GD1b implica, por tanto, efectos directos sobre la proliferación tumoral y la muerte del glioma por apoptosis. A esto se suma el efecto mostrado por la neurostatina inhibiendo la angiogénesis tumoral y reduciendo la invasividad del glioma, determinando una potente acción anti-tumoral sobre tumores del SNC.

3. MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DE LA NEUROSTATINA Y O-BUT GD1b

Los resultados obtenidos en este trabajo, junto con las evidencias previas (Abad-Rodriguez y cols., 1998; Abad-Rodriguez y cols., 2000; Romero-Ramirez y Nieto-Sampedro, 2004), sustentan la eficacia de la neurostatina y sus derivados como compuestos anti-tumorales en gliomas. Sin embargo, el mecanismo a través del cual ejerce su acción ha permanecido inexplorado, en parte debido a la reducida disponibilidad del gangliósido. Las evidencias experimentales obtenidas en este trabajo han permitido cubrir este vacío, aportando información sobre las vías y dianas de actuación de la neurostatina y sus derivados.

Inhibición de la progresión del ciclo celular

Los resultados obtenidos sugieren que la parada de la división celular podría formar parte de la acción de la neurostatina y O-But GD1b sobre el crecimiento tumoral. El análisis por citometría de flujo indica que ambos gangliósidos revierten la progresión en el ciclo celular provocada por el mitógeno EGF, produciéndose la parada de las células en la fase G₁, en ambas líneas de glioma (U373MG y C6). A tenor de los resultados obtenidos, este efecto es consecuencia del bloqueo de la transición de G₁ a fase S, a nivel del punto de restricción (R). Salvo pequeñas diferencias, neurostatina y O-But GD1b parecen compartir el mismo modo de acción sobre las células tumorales, inhibiendo la proliferación celular y regulando las proteínas implicadas en el control de la progresión del ciclo. De este modo, los xenotransplantes de C6 en ratones desnudos tratados, tanto con neurostatina como con O-but GD1b, sobreexpresan, a las 30 horas, los inhibidores del ciclo celular p21 y p27, y tienen reducida la expresión de ciclina D1 y CDK6. Esto indica que neurostatina y O-But GD1b interfieren sobre la activación constitutiva de la división de las células de glioma, regulando las proteínas implicadas en el ciclo celular. Los inhibidores del ciclo p21 y p27 actúan sobre los complejos ciclinas-CDKs que promueven la transición de G₁ a la fase S (Wang y cols., 2009). Por consiguiente, la acción de ambos gangliósidos sobre las proteínas que regulan la

progresión del ciclo celular tiene como consecuencia una disminución en la mitosis de las células del tumor, evidenciada en nuestros resultados *in vivo* por la reducción de la fosforilación de la histona H3, y la reducción de la proliferación tumoral, indicada por una menor tasa de incorporación de BrdU. Estas observaciones, unidas a los estudios del ciclo celular mediante citometría de flujo *in vitro* y mediante western blot *in vivo*, nos indican que se está produciendo una parada de la división de las células en la fase G₁.

Profundizando en el estudio del mecanismo por el cual el gangliósido neurostatina inhibe la proliferación de los gliomas, observamos cómo este glicolípido disminuye la expresión de fosfo-histona H3 inducida por el factor de crecimiento EGF en la línea de astrocitoma humano U373MG, reduciéndose la mitosis hasta 3,5 veces, a las 24 horas de la inducción de la división por el mitógeno. Focalizándonos en el estudio del control del ciclo celular, la estimulación con factores de crecimiento aumenta la expresión de ciclinas D, una de las proteínas que controlan el punto de restricción (R), y que determina el paso de G1 a S (Pardee, 1989). El tratamiento de las células U373MG con el mitógeno EGF provoca un aumento de la expresión de las ciclinas D1 y D3, que forman complejos con las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y 6, cuya expresión también está aumentada (Fig. 34). Este aumento de la expresión, tanto de las ciclinas, como de las CDKs, es máximo a las 12-14 horas de la estimulación con el mitógeno, y coincide con la disminución en la expresión de los inhibidores de ciclo celular p21 y p27, los cuales inhiben los complejos ciclina-CDK (Fig. 34). Los complejos ciclina D-CDK4 y 6 formados se encargan de fosforilar la proteína de retinoblastoma Rb, condición indispensable para que se libere el factor de transcripción E2F que determina la progresión del ciclo celular a fase S (Sherr, 1996). De este modo, la estimulación con el mitógeno desencadena la activación de la maquinaria de división. Sin embargo, el pretratamiento de las células con neurostatina, antes de inducir la división celular con el mitógeno EGF, causa un cambio en la expresión de las proteínas reguladoras de la progresión del ciclo celular, coincidiendo con los resultados observados en los xenotransplantes de células C6. La neurostatina bloquea el aumento de la expresión de las ciclinas D1 y D3 inducido por EGF, permaneciendo sus niveles cercanos a la situación en reposo, siendo este efecto más evidente a las 12-14 horas tras la estimulación con el mitógeno, momento en el que su expresión al tratar con el mitógeno exclusivamente era máxima (Fig.34). La neurostatina también provoca el bloqueo de la expresión de las quinasas CDK4 y CDK6, implicadas igualmente en el inicio de la división celular, ya que forman complejos con las ciclinas D1 y D3, los cuales comienzan a fosforilar la proteína de retinoblastoma (Rb) en la mitad de la fase G1 (Sherr, 1996). Por otra parte, la neurostatina hace que la reducción de la expresión de los inhibidores de ciclo celular p21 y p27, inducida por el mitógeno, se vea contrarestanda, observándose un aumento en la expresión de ambos inhibidores durante las primeras 12-14 horas tras la estimulación con EGF, sobre todo de p21 (Fig.34). Este aumento de la expresión de p21 y p27 contribuye a inhibir los complejos ciclina quinasas. Todo esto provoca que los pocos complejos ciclina D-CDK4 y ciclina D-CDK6 que se forman en presencia de neurostatina, no sean suficientes para hiperfosforilar la proteína de retinoblastoma (Rb) presente, observándose una disminución de la fosforilación de los

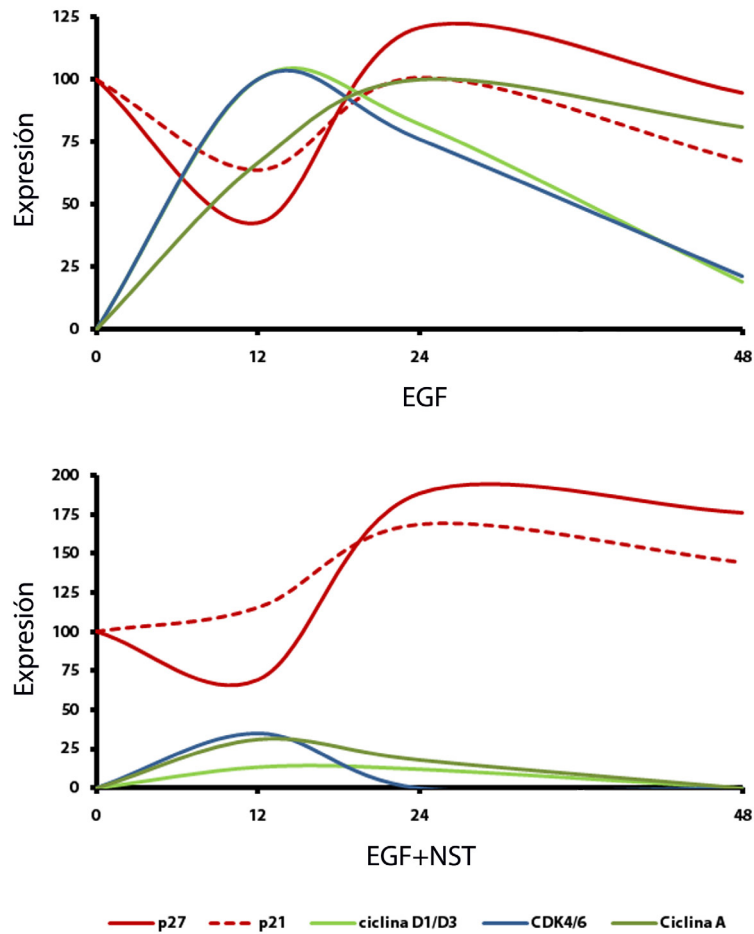


Figura 34. Efecto de la neurostatina sobre la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular.

Representación de la expresión a lo largo del tiempo de las proteínas reguladoras del ciclo celular en células U373MG, en base a los resultados obtenidos por western blotting. En la parte superior se muestra el efecto del mitógeno EGF y en la inferior el tratamiento con EGF+neurostatina. Los datos fueron promediados y relativizados a la expresión obtenida en células U373MG en reposo (control; DMEM), mostrando la expresión inicial de los inhibidores p21 (línea punteada roja) y p27 (línea roja) como 100% de expresión, y la de las ciclinas D1/D3 (línea verde claro), las CDK4/6 (línea azul) y la ciclina A (línea verde oscuro) como 0% de expresión. En el eje de abscisas se muestra el tiempo (h).

residuos de serina 780, 807 y 811 de Rb, desde las 12 horas tras el tratamiento con el mitógeno, lo que impediría la transcripción de los genes necesarios para la progresión del ciclo a fase de síntesis.

La activación de la progresión del ciclo celular con el mitógeno provoca que Rb sea fosforilado progresivamente liberándose el factor de transcripción E2F, que estimula, al final de la fase G1, la síntesis de CDK2 y ciclina E, proteínas necesarias para la síntesis de ADN (Mittnacht y cols., 1994). Según los resultados del array de PCR, la neurostatina reduce la expresión de los genes Rb1 y E2F, respecto al tratamiento con EGF a las 24 horas. Por tanto, la disponibilidad de proteína Rb susceptible de fosforilación se reduce, así como el factor de transcripción E2F, impulsor la síntesis de ciclina E-CDK2. De este modo, la expresión de los

genes, tanto de ciclina E como de CDK2, con la cual forma complejos, están significativamente disminuidos en las células tratadas con EGF y neurostatina. Los complejos ciclina E-CDK2 son necesarios para el progreso de G1 a S, al encargarse nuevamente de inactivar Rb y favorecer la acción de E2F (Kitagawa y cols., 1996), por tanto la neurostatina también impide, a este nivel, la transición del ciclo celular. Al mismo tiempo, la neurostatina provoca una disminución significativa de la expresión de CDC25A. CDC25A está implicado en la progresión del ciclo celular desde G1 a S, al activar las ciclinas dependientes de quinasas CDK4 y CDK2, teniendo también un papel importante en eventos más tardíos del ciclo celular, activando la principal ciclina dependiente de quinasa mitótica cdc2 (Brezak y cols., 2008). La disminución de la expresión de CDC25A a las 24 horas del tratamiento con neurostatina favorecería la inhibición de CDK2 y otras CDKs implicadas en fases avanzadas del ciclo, siendo muy probable que este efecto también se haya producido a tiempos más cortos, influyendo en la inhibición de las ciclinas tempranas como CDK4. Adicionalmente, los resultados de western blot indican que la acción de la neurostatina sobre la sobreexpresión de p21 y p27 se mantiene a las 24h del tratamiento, coincidiendo con una disminución significativa de la expresión de los genes CDK2A y CDK1A, los cuales codifican para los inhibidores de ciclo p16 y p21. El inhibidor p21, como ya hemos visto, inhibe los complejos ciclina-CDK encargados de hiperfosforilar Rb, y el inhibidor p16 se encarga de bloquear la actividad quinasa de las CDKs (Xiong y cols., 1993; Hirai y cols., 1995).

Siguiendo con la progresión del ciclo celular, una vez que las células estimuladas con el mitógeno entran en fase S, se produce la degradación de la ciclina E, y la unión de CDK2 a la ciclina A, que como observamos en el gráfico (Fig.34), ve aumentado su expresión, siendo máxima a las 24 horas. Los complejos ciclina A-CDK2 se encargan de fosforilar factores de transcripción y proteínas requeridas para completar la salida de la fase S (Fotedar y Fotedar, 1995). En el sistema pretratado con neurostatina, se bloquea el aumento en la expresión de la ciclina A provocado por EGF, observándose cantidades de ciclina A muy bajas. Simultáneamente, CDK2 ve disminuida su expresión génica. Estos resultados indicarían un defecto en la progresión de la fase S en respuesta al tratamiento con la neurostatina, probablemente debido al bloqueo de la progresión desde fases anteriores.

Los resultados obtenidos mediante arrays de PCR también nos han permitido analizar la expresión diferencial de genes implicados en la reparación de daño a ADN, como son ATM, MDM2, CHEK2 y TP53, que bloquean la progresión del ciclo celular. Los resultados indican que la neurostatina produce una represión significativa de ATM, coincidiendo con una leve reducción en la expresión de TP53, MDM2 y CHEK2, genes regulados por ATM (Caspari y Carr, 2002). Si tenemos en cuenta que la activación de la señalización de EGFR induce una represión de ATM, aumentando la sensibilidad celular a la radiación (Gueven y cols., 2001), el efecto de la neurostatina estaría incrementado esta respuesta. Sin embargo, estos resultados no nos permiten extraer conclusiones acerca del efecto de la neurostatina sobre la regulación del daño al ADN, ya que las células empleadas como modelo (U373MG) tienen mutada la actividad de p53 (Russell y cols., 1995), proteína clave en reparación de daño a ADN, y en la que desembocan la mayor parte de las acciones de los genes anteriores ATM, MDM2 y

CHEK2 (Caspari y Carr, 2002). Un efecto similar es observado en la expresión de S100A4, aumentada con respecto a EGF al tratar con neurostatina. S100A4 está implicada en la progresión del ciclo de la fase S a G2, a través del secuestro de p53 (EL y cols., 2004), aspecto que dificulta la interpretación de los resultados al estar p53 mutada en la línea celular usada en este experimento (Russell y cols., 1995). Por lo tanto, para obtener una información más adecuada sobre como la neurostatina afecta a las moléculas implicadas en la parada de ciclo celular debido a un daño en el DNA sería necesario llevar a cabo los experimentos en otra línea celular de glioma que presentase intacta la vía de señalización de p53, aspecto que será abordado en futuros trabajos.

Del estudio del efecto de la neurostatina sobre el ciclo celular se deduce que estos gangliósidos están provocando la regulación de la división celular incontrolada de las células de glioma, actuando sobre la expresión de las proteínas reguladoras de la división (ciclina D1, D3 y E, CDK4, 6 y 2, CDC25A, p21, p27 y p16, Rb, EGF) y provocando la disminución de la división de las células tumorales. La acción de la neurostatina sobre el ciclo celular coincide con la de otros gangliósidos expresados en el SNC, propuestos como reguladores de la progresión del ciclo celular. Por ejemplo, se ha observado que la deficiencia de gangliósidos, en la línea celular de queratinocitos humanos SCC12, aumenta la expresión de las ciclinas D1 y E, promoviendo la progresión del ciclo celular de G1 a fase S (Sun y cols., 2002). De manera similar, el gangliósido GM3 inhibe selectivamente la proliferación de astrocitos y otras células neurales, a través del inhibidor de complejos ciclina-CDK p27 (Nakatsuji y Miller, 2001), siendo también efectivo sobre el control del crecimiento de gliomas humanos (Noll y cols., 2001). También se ha comprobado que GM3 aumenta la expresión de los inhibidores de ciclo celular p21 y p27, en la línea de cáncer de colon HCT116 (Choi y cols., 2006).

Inhibición de la activación de EGFR y sus vías de señalización intracelular

Los estudios sobre la acción anti-tumoral de la neurostatina se han realizado empleando EGF como estímulo mitótico, siendo el gangliósido altamente efectivo a la hora de bloquear sus efectos. Este hecho nos indica que la neurostatina podría estar interaccionando con las vías de señalización activadas por el receptor de EGF, las cuales desembocan en la activación de la progresión del ciclo celular y la división.

Para evaluar el potencial efecto de la neurostatina sobre la señalización de EGF se estudió la activación de EGFR, mediante el análisis del grado de fosforilación de residuos del receptor claves para su señalización intracelular. Al añadir EGF a las células de astrocitoma humano U373MG, el ligando se une a EGFR, provocando la dimerización y autofosforilación del receptor, activándose diferentes vías de señalización. El tratamiento con neurostatina, previa adición del mitógeno EGF, no varía significativamente la cantidad de receptor de EGF en las células, pero si causa una disminución significativa de su fosforilación, y por tanto de su activación. Este efecto de la neurostatina sobre la disminución de la activación de EGFR se observa en tres residuos de tirosina distintos del receptor, a tiempos muy cortos tras la adición del mitógeno. La reducción en la fosforilación del residuo Tyr₉₉₂, conlleva una

reducción de la unión de la fosfolipasa C gamma (PLC- γ) a EGFR, inactivándose su vía de señalización (Emlet y cols., 1997), que actúa a través de la proteína quinasa C (PKC), activando a las MAP quinasas ERK (New y Wong, 2003). El residuo Tyr₁₀₄₅ fosforilado es el lugar de unión de la proteína adaptadora c-Cbl, lo que provoca la ubiquitinación del receptor y la degradación del mismo, después de su activación (Levkowitz y cols., 1999; Ettenberg y cols., 1999), como mecanismo de autoregulación. La reducción de la fosforilación de este residuo tras el tratamiento con neurostatina indica una disminución del número de receptores de EGF activados y, por tanto, dirigidos a la degradación. La neurostatina también actúa a nivel de la fosforilación del residuo Tyr₁₀₆₈, lugar de unión de la proteína Grb2 a EGFR (Rojas y cols., 1996). La reducción de la fosforilación de este residuo por parte del gangliósido provoca la reducción de la activación de la proteína Ras, ya que la disminución de los sitios de unión de Grb2 a EGFR, reduce la unión de Grb2 a la proteína Sos y, finalmente, la activación de Ras por parte de Sos, que intercambia nucleótidos de GDP por GTP con ella (Egan y cols., 1993). Adicionalmente, hemos observado que la neurostatina también reduce la activación (fosforilación) de Shc, proteína adaptadora que se une a Grb2/Sos (Salcini y cols., 1994), bloqueando el segundo camino de activación de Ras. De este modo, la neurostatina bloquea la activación de la vía de señalización de Ras/Raf/MAPK, a través de la inhibición de la activación de EGFR.

La proteína Ras promueve división celular a través de varias vías de señalización como la de PI3K, aunque su vía clásica de señalización es la de las MAPK. Si el tratamiento con el gangliósido disminuye la activación de EGFR que conduce a la activación de Ras, la vía de las MAPK estará por tanto inhibida, lo que se refleja en las cuantificaciones de las proteínas y la expresión de los genes implicados. De este modo, la expresión génica de Raf, proteína activada por Ras y que activa la siguiente quinasa, esta significativamente reducida al tratar con neurostatina. Esta vía desemboca en la activación (fosforilación) de las quinasas ERK1 y ERK2, que aparece consecuentemente reducida al tratar con neurostatina. Esto tendría como consecuencia la disminución de la expresión de los genes tempranos C-JUN, C-ETS-2, C-MYC y C-FOS, regulados por la vía de las MAPKs (Chuang y Ng, 1994; Treisman, 1996). Nuestros resultados coinciden con lo esperado y muestran una reducción significativa de la expresión génica de C-MYC y C-FOS en respuesta al tratamiento con neurostatina. Por otra parte, la neurostatina también afecta a la activación de la vía de la PI3K, activada por el receptor de EGFR. Como se observa en los resultados del array de PCR, la expresión del gen que codifica para PI3K esta significativamente disminuida en las células de astroglioma tratadas con neurostatina, así como la expresión del gen de Akt, proteína que se encuentra más adelante en esta vía de señalización. La reducción de Akt conlleva el aumento de la proteína GSK3 β , la cual contribuye a la inhibición de c-Myc y del factor de transcripción activado por c-Fos AP-1 (Diehl y cols., 1998; Gregory y cols., 2003).

El bloqueo de la expresión de C-MYC y C-FOS repercute directamente sobre las proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular, al tener como consecuencia la disminución en la expresión de las ciclinas D1 y D2, y de la ciclina dependiente de quinasa CDK4 (Lavoie y cols., 1996; Weber y cols., 1997; Kapoor y O'Rourke, 2003). Por otra parte, las MAPK fosforilan a

p27 (Kawada y cols., 1997), provocando su degradación por la vía de la ubiquitinación. Por lo tanto, la disminución en la expresión de las ciclinas y de las CDKs, así como el aumento de los inhibidores de ciclo, que provoca la parada del ciclo celular en las células tratadas con neurostatina, sería consecuencia del bloqueo de la activación de las vías de señalización de EGFR, MAPK y PI3K, que repercuten directamente sobre las proteínas reguladoras del ciclo celular.

Las vías de las MAPK/ERK y de PI3K/AKT, también determinan una respuesta anti-apoptótica ante la presencia de factores de crecimiento en el entorno celular (Bhattacharya y cols., 2004). El efecto protector de la apoptosis activado por las proteínas ERK consiste en la activación de miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 como Bcl-xl, así como la inhibición de la caspasa 8 y de Bax, encargado de la liberación de citocromo c (Deng y cols., 2000; Mori y cols., 2003). Akt también interviene impidiendo la apoptosis, al fosforilar proteínas como Bad (Datta y cols., 1997) y caspasa 9 (Cardone y cols., 1998) que intervienen en procesos apoptóticos. Por tanto, el bloqueo de las vías de señalización activadas por el receptor de EGF, observado en el tratamiento de las células de glioma con neurostatina, debería influir en la activación de la apoptosis, a través de la disminución en la expresión de ERK y AKT. En este sentido, el tratamiento de las células de astrocitoma humano U373MG con neurostatina causa, ya a las 24 horas, una sobreexpresión significativa del gen de la proteína pro-apoptótica Bad, y una reducción significativa de la expresión del gen de la proteína anti-apoptótica Bcl-xl (BCL2L1). Esto sumado al aumento significativo en la expresión de HTATIP2 (también llamado CC3 o TIP 30), factor pro-apoptótico que inhibe a Bcl-xl, tiene como consecuencia la inducción de la apoptosis a través de la liberación de citocromo c de las mitocondrias y la activación de las caspasas 3 y 9 (Shi y cols., 2008). Estos resultados coinciden con el hecho de que en el tratamiento de tumores intracraneales en rata con neurostatina, se observan células tumorales positivas para caspasa-3 activada, indicando inducción de la muerte por apoptosis de las células de glioma. Sin embargo, cabe destacar que los genes pro-apoptóticos de Bax, caspasa-8 y Apaf-1 no se encuentran sobre-expresados ante el tratamiento con neurostatina, aunque los resultados no son estadísticamente significativos. Esto nos lleva a considerar la posibilidad de que la neurostatina puede inducir apoptosis por mecanismos independientes de la activación de caspasas, por ejemplo, a través de granzima A, cuyo gen está sobre-expresado en las células tratadas con el gangliósido. La granzima A es una serin-proteasa que activa apoptosis provocando una disfunción mitocondrial independiente de caspasas (Martinvalet y cols., 2008). Adicionalmente, otros sistemas podrían estar implicados en la inducción de apoptosis de las células tumorales por la neurostatina, como la inhibición de la vía de STAT (Lui y Grandis, 2002), activada por el receptor de EGF e implicada en apoptosis.

La señalización sinérgica entre las vías de señalización activadas por factores de crecimiento y las activadas por integrinas es clave para el crecimiento tumoral (Giancotti y Ruoslahti, 1999). En este sentido, la interacción de los gangliósidos con integrinas ha sido ampliamente descrita, ya que ambos se encuentran juntos en micro-dominios de membrana (rafts) lo que facilita su interacción. GD3 y GD2 se unen a las integrinas $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha v\beta 3$

(Cheresh y cols., 1987;Wang y cols., 2001). El gangliósido GT1b se une directamente a $\alpha 5\beta 1$, afectando a las vías de señalización que activa, inhibiendo adhesión e induciendo apoptosis (Sun y cols., 2002). En el presente trabajo, la posible interacción de la neurostatina con integrinas no ha sido evaluada, pero teniendo en cuenta que las integrinas activan vías coincidentes con las activadas por EGFR, no se descarta la interacción de la neurostatina sobre los sistemas activados por integrinas. Los datos experimentales indican que el tratamiento con neurostatina induce una represión general de la expresión de integrinas, como se observa con ITGB1, o ITGB1-5. Esto apunta a una potencial inhibición de la señalización activada por integrinas, lo cual sería de relevante importancia para mediar procesos como la adhesión al sustrato (Juliano, 2002). También apoyaría, en parte, los resultados obtenidos sobre la regulación de la apoptosis, ya que la activación de la vía de señalización de las integrinas tiene un efecto anti-apoptótico indirecto, a través de la vía de Akt (Khwaja y cols., 1997). Por otro lado, la neurostatina induce la sobre-expresión de la integrina B3 (ITGB3), la cual media parte de sus acciones a través de la unión a Syk (Gao y cols., 1997), también sobre-expresada en este sistema. El efecto de la neurostatina sobre la regulación de este sistema aparece así como una potencial vía de actuación del gangliósido, que deberá ser estudiada en profundidad en futuros trabajos, con el fin de determinar posibles acciones sobre funciones claves para el desarrollo tumoral.

El papel de los gangliósidos como reguladores de la actividad de EGFR ha sido descrito en numerosos trabajos (Miljan y Bremer, 2002;Rebbaa y cols., 2004). En este sentido, cabe destacar los estudios realizados con el gangliósido GM3. La proliferación mediada por el EGF en células de carcinoma epidérmico es inhibida por el gangliósido GM3 (Bremer y cols., 1986). En las células A1S, derivadas de la línea tumoral epitelial A431, GM3 inhibe la actividad de las MAP quinasas y de la PI3K, lo que conlleva la inhibición de la expresión de los genes tempranos c-fos y c-jun (Rebbaa y cols., 1996). La regulación de EGFR también ha sido estudiada para otros gangliósidos. Por ejemplo, en células K1 de ovario de hamster chino GD3 disminuye la fosforilación de EGFR y la de ERK2 (Zurita y cols., 2001). Por el contrario, GD1a estimula la activación de EGFR, aumentando la auto-fosforilación del receptor y la activación de Ras/MAPK en células NHDF (Liu y cols., 2004). Sin embargo, se ha descrito que GD1a, GT1b y GM3 inhiben la proliferación de células de neuroblastoma humano (NBL-W) al inhibir la fosforilación de EGFR (Mirkin y cols., 2002). Pero la inhibición de la proliferación por parte de los gangliósidos no se limita a sus acciones sobre EGFR. Así, la proliferación de células 3T3 y las células de neuroblastoma SH-SY5Y mediada por PDGF (Bremer y cols., 1984;Yates y cols., 1993;Hynds y cols., 1995), la proliferación de la línea de fibroblastos BKH mediada por FGFb (Bremer y Hakomori, 1982;Nojiri y cols., 1991) y la proliferación de las células de leucemia HL-60 mediada por el factor de crecimiento insulínico (Nakatsuji y Miller, 2001), son todas inhibidas por la adición exógena de GM3. Otros gangliósidos como GM1 y GM2 inhiben la proliferación mediada por PDGF en células de músculo liso (Sachinidis y cols., 1996), a través de la inhibición de PLC- γ , observándose reducción de la expresión de c-fos. GM1 y GM2 inhiben la proliferación mediada por bFGF en células endoteliales, observándose inhibición de la actividad de PLC- γ , MAP quinasa y PKC (Slevin y cols., 1999). De este modo,

los gangliósidos son parte fundamental en la regulación de la división celular mediada por factores de crecimiento, y el efecto descrito para la neurostatina podría hacerse extensivo a otros tipos celulares, en relación a fenómenos tanto patológicos como relacionados con el desarrollo y diferenciación del SNC.

A la luz de los resultados obtenidos, la neurostatina inhibe la activación de EGFR inducida por el ligando EGF, afectando directamente a la fosforilación del receptor. Sin embargo, la inhibición de la proliferación celular causada por la neurostatina no es específica de EGF, sino que también se produce con la inducción por otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento plaquetario (PDGF-B)(Romero-Ramirez y Nieto-Sampedro, 2004), el cual también es un receptor con actividad tirosina quinasa. Es lógico pensar que el gangliósido neurostatina interfiere directamente en la activación de los receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa, que activan las vías de señalización de las MAPK y de PI3K (Lui y Grandis, 2002). Pese a que el estudio de la relación entre los gangliósidos y los factores de crecimiento entraña una alta dificultad, observándose resultados contradictorios, en la bibliografía está ampliamente descrita la modulación de los receptores de factores de crecimiento por gangliósidos, describiéndose varios posibles mecanismos de regulación. Un primer mecanismo consiste en la interacción directa del ligando con el receptor. FGF interacciona directamente con el gangliósido GM1, impidiendo la unión a su receptor (FGFR)(Rusnati y cols., 1999). GT1b, GD1b, GM1a y GM2 interaccionan directamente con el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2 o FGFb) impidiendo la unión a su receptor (FGFR)(Rusnati y cols., 1999). Otro mecanismo consiste en la acción del gangliósido sobre la dimerización del receptor o sobre su actividad tirosina quinasa del receptor. De este modo, GM3 inhibe la auto-fosforilación de EGFR, independiente de la unión del ligando (Bremer y cols., 1986), inhibiendo la dimerización del receptor, pero por otra parte también se une al dominio extracelular de EGFR inhibiendo la actividad tirosina quinasa (Miljan y cols., 2002). La dimerización de PDGFR también es inhibida por los gangliósidos GM1, GM2, GD1a, GD1b, GD3, y GT1b (Van Brocklyn y cols., 1993). Y los gangliósidos GM2, GD3 y GM4 también se unen al dominio extracelular de EGFR, inhibiendo su actividad (Miljan y cols., 2002). El estudio de las formas de interacción de los gangliósidos con los factores de crecimiento se complica si tenemos en cuenta que los mecanismos anteriores no son excluyentes (Miljan y Bremer, 2002). Además, estos mecanismos descritos no explican todas las observaciones experimentales realizadas acerca de la relación entre gangliósidos y receptores tirosina quinasa, surgiendo un nuevo mecanismo que sugiere que los gangliósidos modulan el estado de activación del receptor y su localización subcelular. Por ejemplo, GM1 actúa sobre la activación de PDGFR, alterando el curso de expresión de los genes que se activan por esta vía, observándose un acortamiento en el tiempo de activación de las MAP quinastas (Mitsuda y cols., 2002). A esto se suma el hecho de que GM1 modula la localización subcelular de PDGFR, causando la dispersión de PDGFR de los microdominios enriquecidos con gliocolípidos, donde PDGFR está agregado en condiciones normales (Mitsuda y cols., 2002). En nuestro modelo, no disponemos de evidencias experimentales que apoyen alguno de estos posibles modos de interacción entre neurostatina y EGFR. Los

resultados indican que la neurostatina no disminuye totalmente la activación de EGFR y la vía de ERK, sino que reduce el grado de fosforilación observado con la estimulación con EGF a la mitad. Esto concuerda con el hecho de que la concentración empleada para estos experimentos *in-vitro* corresponda a la ID_{50} , dosis a la que se inhibe la proliferación del 50% de las células, e indicaría que la mayor parte de los efectos observados se producen a través de EGFR. Por tanto, se mantienen abiertas todas las posibilidades de interacción entre la neurostatina, EGF y EGFR, siendo necesario un estudio en profundidad de las interacciones moleculares.

En resumen, en el presente trabajo hemos descrito un nuevo método de obtención de neurostatina (O-Ac GD1b) y su derivado butirilado O-But GD1b, mediante síntesis química, que ha permitido el estudio de las propiedades anti-tumorales de estos gangliósidos en modelos *in vivo*, presentando una potente acción anti-proliferativa, anti-angiogénica y anti-invasiva. A su vez, hemos descrito como el mecanismo de acción anti-tumoral de la neurostatina se basa en la regulación de la activación de EGFR y de las proteínas reguladoras del ciclo celular, teniendo como principales consecuencias la parada del ciclo celular y la inducción de vías pro-apoptóticas, mecanismo también sugerido para O-but GD1b, cuyo comportamiento siempre ha sido paralelo al de la neurostatina. La actividad tirosina quinasa del receptor de EGF es considerada una importante diana farmacológica para inhibir el crecimiento de las células tumorales, debido a que el aumento de la proliferación tumoral está provocado por un aumento en la actividad del receptor de EGFR en una gran cantidad de tumores, incluidos la mayoría de los glioblastomas multiformes (Lund-Johansen y cols., 1990). Numerosos estudios han analizado varias drogas que han mostrado efectos inhibitorios en la actividad del receptor de EGFR en glioblastomas y se encuentran en la actualidad en ensayos clínicos (Nyati y cols., 2006; Reardon y cols., 2006; Furnari y cols., 2007; Brandes y cols., 2008). Los factores de crecimiento y los glicoconjugados, son capaces de interaccionar unos con otros, modulando la señalización trófica y la biología de la célula. De este modo, y como conclusión general, podemos decir que el uso de la neurostatina o sus derivados puede representar una nueva aproximación para modular el comportamiento proliferativo de los gliomas, especialmente sobre los que sobre-expresan receptores de factores de crecimiento, surgiendo así como una potencial terapia anti-tumoral muy prometedora.

CONCLUSIONES

- 1) El método de O-sustitución química permite la obtención de derivados O-acetilados y O-butilados del gangliósido GD1b, habiéndose sintetizado O-Ac GD1b o neurostatina, O-But GD1b y los derivados de ambos varias veces O-sustituídos.
- 2) Los derivados de GD1b O-acetilados y O-butilados presentan una elevada actividad inhibidora de la proliferación de líneas de glioma de rata y humano, destacando la efectividad de los derivados mono-sustituídos neurostatina (9-O-Ac GD1b; $ID_{50}=0,2-2\mu M$) y O-But GD1b ($ID_{50}=0,3-0,8\mu M$).
- 3) El aumento del número de O-sustituciones en GD1b no aumenta significativamente la actividad anti-proliferativa con respecto a las especies mono-sustituídas. En cambio, la sustitución del radical acetilo de la neurostatina por un radical con cadena alifática más larga, como es el radical butirilo, incrementa la estabilidad del gangliósido, mejorando su actividad anti-tumoral sobre líneas de glioma.
- 4) Los gangliósidos neurostatina y O-But GD1b reducen, a concentraciones muy bajas, el crecimiento *in vivo* de xenotransplantes de astrocitoma humano (U373MG) y de glioma de rata (C6) en ratones desnudos, siendo más acusado el efecto del gangliósido butirilado. Ambos gangliósidos afectan de forma directa a la expresión de los reguladores de la progresión del ciclo celular (Ciclina D1, CDK6, p21 y p27), inhibiendo la proliferación de las células tumorales.
- 5) El tratamiento de alotransplantes intraestriales de células de glioma C6 con neurostatina o con O-But GD1b reduce el crecimiento tumoral, disminuyendo la proliferación de las células del tumor e induciendo su muerte por apoptosis, siendo más acusado el efecto de la neurostatina. Ambos gangliósidos inducen, directa o indirectamente, el reclutamiento de células inmunes (linfocitos T y macrófagos) al parénquima tumoral, que colaboran a la eliminación del glioma.
- 6) El mecanismo de acción anti-proliferativo de la neurostatina implica la regulación del ciclo celular de las células de glioma, inhibiendo la expresión de los promotores (ciclinas D1, D3, E y A, CDK2, 4 y 6, CDC25A y Rb) y aumentando la expresión de los inhibidores (p21, p27 y p16) de la progresión del ciclo celular, provocando finalmente la parada de las células tumorales en G_1 .
- 7) El mecanismo de acción molecular de la neurostatina implica la inhibición de la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células de glioma, así como la inhibición de las vías de señalización de las MAPK y de la PI3K, activadas por factores tróficos.

8) La neurostatina regula la expresión génica de mediadores de angiogénesis ($\text{VEGF}\alpha$, $\text{PDGF}\beta$ y angiopoietina-2), adhesión y metástasis (MMP2, TIMP1, TIMP3. MMP2, PLAU/PLAUR, SERPINB5 y HGF), procesos fundamentales para la tumorigenicidad de los gliomas.

9) Los gangliósidos neurostatina y O-But GD1b ejercen una acción directa sobre la proliferación y supervivencia de las células tumorales, estableciéndose como potentes herramientas para la inhibición del crecimiento de gliomas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Rodriguez J, Bernabe M, Romero-Ramirez L, Vallejo-Cremades M, Fernandez-Mayoralas A, Nieto-Sampedro M (2000) Purification and structure of neurostatin, an inhibitor of astrocyte division of mammalian brain. *J Neurochem* 74:2547-2556.
- Abad-Rodriguez J, Vallejo-Cremades M, Nieto-Sampedro M (1998) Control of glial number: purification from mammalian brain extracts of an inhibitor of astrocyte division. *Glia* 23:156-168.
- Alessandri G, Filippeschi S, Sinibaldi P, Mornet F, Passera P, Spreafico F, Cappa PM, Gullino PM (1987) Influence of gangliosides on primary and metastatic neoplastic growth in human and murine cells. *Cancer Res* 47:4243-4247.
- Amat JA, Ishiguro H, Nakamura K, Norton WT (1996) Phenotypic diversity and kinetics of proliferating microglia and astrocytes following cortical stab wounds. *Glia* 16:368-382.
- Anderson RG (1998) The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67:199-225.
- Ando S (1984) [Gangliosides in the nervous system]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 29:1146-1159.
- Asahara T, Bauters C, Zheng LP, Takeshita S, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM (1995) Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92:II365-II371.
- Berra B, Gaini SM, Riboni L (1985) Correlation between ganglioside distribution and histological grading of human astrocytomas. *Int J Cancer* 36:363-366.
- Besson A, Yong VW (2001) Mitogenic signaling and the relationship to cell cycle regulation in astrocytomas. *J Neurooncol* 51:245-264.
- Bhattacharya S, Ray RM, Johnson LR (2004) Prevention of TNF-alpha-induced apoptosis in polyamine-depleted IEC-6 cells is mediated through the activation of ERK1/2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G479-G490.
- Birkle S, Gao L, Zeng G, Yu RK (2000) Down-regulation of GD3 ganglioside and its O-acetylated derivative by stable transfection with antisense vector against GD3-synthase gene expression in hamster melanoma cells: effects on cellular growth, melanogenesis, and dendricity. *J Neurochem* 74:547-554.
- Birkle S, Zeng G, Gao L, Yu RK, Aubry J (2003) Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* 85:455-463.
- Bogler O, Huang HJ, Kleihues P, Cavenee WK (1995) The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* 15:308-327.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Hegi ME, Stupp R (2008) Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments. *Clin Cancer Res* 14:957-960.
- Bremer EG, Hakomori S (1982) GM3 ganglioside induces hamster fibroblast growth inhibition in chemically-defined medium: ganglioside may regulate growth factor receptor function. *Biochem Biophys Res Commun* 106:711-718.
- Bremer EG, Hakomori S, Bowen-Pope DF, Raines E, Ross R (1984) Ganglioside-mediated modulation of cell growth, growth factor binding, and receptor phosphorylation. *J Biol Chem* 259:6818-6825.
- Bremer EG, Schlessinger J, Hakomori S (1986) Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 261:2434-2440.
- Brezak MC, Kasprzyk PG, Galcera MO, Lavergne O, Prevost GP (2008) CDC25 inhibitors as anticancer agents are moving forward. *Anticancer Agents Med Chem* 8:857-862.
- Butor C, Higa HH, Varki A (1993) Structural, immunological, and biosynthetic studies of a sialic acid-specific O-acetyltransferase from rat liver. *J Biol Chem* 268:10207-10213.

- Byrne MC, Farooq M, Sbaschnig-Agler M, Norton WT, Ledeen RW (1988) Ganglioside content of astroglia and neurons isolated from maturing rat brain: consideration of the source of astroglial gangliosides. *Brain Res* 461:87-97.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321.
- Caspari T, Carr AM (2002) Checkpoints: how to flag up double-strand breaks. *Curr Biol* 12:R105-R107.
- Cheresh DA, Pierschbacher MD, Herzig MA, Mujoo K (1986) Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J Cell Biol* 102:688-696.
- Cheresh DA, Pytela R, Pierschbacher MD, Klier FG, Ruoslahti E, Reisfeld RA (1987) An Arg-Gly-Asp-directed receptor on the surface of human melanoma cells exists in a divalent cation-dependent functional complex with the disialoganglioside GD2. *J Cell Biol* 105:1163-1173.
- Cheresh DA, Reisfeld RA, Varki AP (1984) O-acetylation of disialoganglioside GD3 by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant. *Science* 225:844-846.
- Chi DD, Merchant RE, Rand R, Conrad AJ, Garrison D, Turner R, Morton DL, Hoon DS (1997) Molecular detection of tumor-associated antigens shared by human cutaneous melanomas and gliomas. *Am J Pathol* 150:2143-2152.
- Choi HJ, Chung TW, Kang SK, Lee YC, Ko JH, Kim JG, Kim CH (2006) Ganglioside GM3 modulates tumor suppressor PTEN-mediated cell cycle progression--transcriptional induction of p21(WAF1) and p27(kip1) by inhibition of PI-3K/AKT pathway. *Glycobiology* 16:573-583.
- Chou DK, Flores S, Jungalwala FB (1990) Identification of disialosyl paragloboside and O-acetyldisialosyl paragloboside in cerebellum and embryonic cerebrum. *J Neurochem* 54:1598-1607.
- Chuang CF, Ng SY (1994) Functional divergence of the MAP kinase pathway. ERK1 and ERK2 activate specific transcription factors. *FEBS Lett* 346:229-234.
- Chunduru S, Kawami H, Gullick R, Monacci WJ, Dougherty G, Cutler ML (2002) Identification of an alternatively spliced RNA for the Ras suppressor RSU-1 in human gliomas. *J Neurooncol* 60:201-211.
- Cichowski K, Shih TS, Jacks T (1996) Nf1 gene targeting: toward models and mechanisms. *Semin Cancer Biol* 7:291-298.
- Claesson-Welsh L (1994) Signal transduction by the PDGF receptors. *Prog Growth Factor Res* 5:37-54.
- Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM (1996) Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 272:877-880.
- Collins I, Garrett MD (2005) Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 5:366-373.
- Comas TC, Tai T, Kimmel D, Scheithauer BW, Burger PC, Pearl DK, Jewell SD, Yates AJ (1999) Immunohistochemical staining for ganglioside GD1b as a diagnostic and prognostic marker for primary human brain tumors. *Neuro Oncol* 1:261-267.
- Coqueret O (2003) New targets for viral cyclins. *Cell Cycle* 2:293-295.
- Corfield AP, Sander-Wewer M, Veh RW, Wember M, Schauer R (1986) The action of sialidases on substrates containing O-acetylsialic acids. *Biol Chem Hoppe Seyler* 367:433-439.
- Costello JF, Berger MS, Huang HS, Cavenee WK (1996) Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 56:2405-2410.
- Costello JF, Plass C, Arap W, Chapman VM, Held WA, Berger MS, Su Huang HJ, Cavenee WK (1997) Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA. *Cancer Res* 57:1250-1254.

Curtin JF, King GD, Candolfi M, Greeno RB, Kroeger KM, Lowenstein PR, Castro MG (2005) Combining cytotoxic and immune-mediated gene therapy to treat brain tumors. *Curr Top Med Chem* 5:1151-1170.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.

Deng X, Ruvolo P, Carr B, May WS, Jr. (2000) Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1578-1583.

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12:3499-3511.

Drazba J, Pierce M, Lemmon V (1991) Studies of the developing chick retina using monoclonal antibody 8A2 that recognizes a novel set of gangliosides. *Dev Biol* 145:154-163.

Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA (1993) Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 363:45-51.

Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP (1992) Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4309-4313.

EL NC, Grum-Schwensen B, Mansouri A, Grigorian M, Santoni-Rugiu E, Hansen T, Kriajevska M, Schafer BW, Heizmann CW, Lukanidin E, Ambartsumian N (2004) Cancer predisposition in mice deficient for the metastasis-associated Mts1(S100A4) gene. *Oncogene* 23:3670-3680.

el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825.

Emanuel SL, Hughes TV, Adams M, Rugg CA, Fuentes-Pesquera A, Connolly PJ, Pandey N, Moreno-Mazza S, Butler J, Borowski V, Middleton SA, Gruninger RH, Story JR, Napier C, Hollister B, Greenberger LM (2008) Cellular and in vivo activity of JNJ-28871063, a nonquinazoline pan-ErbB kinase inhibitor that crosses the blood-brain barrier and displays efficacy against intracranial tumors. *Mol Pharmacol* 73:338-348.

Emlet DR, Moscatello DK, Ludlow LB, Wong AJ (1997) Subsets of epidermal growth factor receptors during activation and endocytosis. *J Biol Chem* 272:4079-4086.

Ettenberg SA, Keane MM, Nau MM, Frankel M, Wang LM, Pierce JH, Lipkowitz S (1999) cbl-b inhibits epidermal growth factor receptor signaling. *Oncogene* 18:1855-1866.

Fakhrai H, Dorigo O, Shawler DL, Lin H, Mercola D, Black KL, Royston I, Sobol RE (1996) Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor β antisense gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2909-2914.

Fan QW, Knight ZA, Goldenberg DD, Yu W, Mostov KE, Stokoe D, Shokat KM, Weiss WA (2006) A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell* 9:341-349.

Fan QW, Weiss WA (2005) RNA interference against a glioma-derived allele of EGFR induces blockade at G2M. *Oncogene* 24:829-837.

Farooqui T, Franklin T, Pearl DK, Yates AJ (1997) Ganglioside GM1 enhances induction by nerve growth factor of a putative dimer of TrkA. *J Neurochem* 68:2348-2355.

Feldkamp MM, Lala P, Lau N, Roncari L, Guha A (1999) Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery* 45:1442-1453.

Fleming TP, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Oldfield EH, Aaronson SA, Ali IU (1992) Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res* 52:4550-4553.

Floutsis G, Ulsh L, Ladisch S (1989) Immunosuppressive activity of human neuroblastoma tumor gangliosides. *Int J Cancer* 43:6-9.

Fotedar R, Fotedar A (1995) Cell cycle control of DNA replication. *Prog Cell Cycle Res* 1:73-89.

Frederick L, Wang XY, Eley G, James CD (2000) Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 60:1383-1387.

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenue WK (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* 21:2683-2710.

Furuhata K (2004) Chemistry of N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac). *Trends Glycosci Glycotech* 16:146-169.

Gao J, Zoller KE, Ginsberg MH, Brugge JS, Shattil SJ (1997) Regulation of the pp72syk protein tyrosine kinase by platelet integrin alpha IIb beta 3. *EMBO J* 16:6414-6425.

Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg GW (1995) Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* 20:269-287.

Ghidoni R, Sonnino S, Tettamanti G, Baumann N, Reuter G, Schauer R (1980) Isolation and characterization of a trisialoganglioside from mouse brain, containing 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid. *J Biol Chem* 255:6990-6995.

Giancotti FG, Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science* 285:1028-1032.

Goldman JE, Reynolds R (1996) A reappraisal of ganglioside GD3 expression in the CNS. *Glia* 16:291-295.

Gomez-Nicola D, Doncel-Perez E, Nieto-Sampedro M (2006) Regulation by GD3 of the proinflammatory response of microglia mediated by interleukin-15. *J Neurosci Res* 83:754-762.

Gomez-Nicola D, Valle-Argos B, Nieto-Sampedro M (2009) Blockade of IL-15 activity inhibits microglial activation through the NFkB, p38 and ERK1/2 pathways, reducing cytokine and chemokine release. *Glia* (in press).

Gomez-Nicola D, Valle-Argos B, Suardiaz M, Taylor JS, Nieto-Sampedro M (2008) Role of IL-15 in spinal cord and sciatic nerve after chronic constriction injury: regulation of macrophage and T-cell infiltration. *J Neurochem* 107:1741-1752.

Gomez-Pinilla F, Knauer DJ, Nieto-Sampedro M (1988) Epidermal growth factor receptor immunoreactivity in rat brain. Development and cellular localization. *Brain Res* 438:385-390.

Gowda DC, Reuter G, Shukla AK, Schauer R (1984) Identification of a disialoganglioside (GD1a) containing terminal N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid in rat erythrocytes. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 365:1247-1253.

Graeber MB, Scheithauer BW, Kreutzberg GW (2002) Microglia in brain tumors. *Glia* 40:252-259.

Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.

Gregory MA, Qi Y, Hann SR (2003) Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J Biol Chem* 278:51606-51612.

Grobbs B, De Deyn PP, Slegers H (2002) Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* 310:257-270.

Gueven N, Keating KE, Chen P, Fukao T, Khanna KK, Watters D, Rodemann PH, Lavin MF (2001) Epidermal growth factor sensitizes cells to ionizing radiation by down-regulating protein mutated in ataxia-telangiectasia. *J Biol Chem* 276:8884-8891.

Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A (1997) Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene* 15:2755-2765.

Haga Y, Hatanaka K, Hakomori SI (2008) Effect of lipid mimetics of GM3 and lyso-GM3 dimer on EGF receptor tyrosine kinase and EGF-induced signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1780:393-404.

- Hakomori S (1990) Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem* 265:18713-18716.
- Hakomori S (1996) Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res* 56:5309-5318.
- Hamel W, Westphal M (2000) Growth factors in gliomas revisited. *Acta Neurochir (Wien)* 142:113-137.
- Hanai N, Nores GA, MacLeod C, Torres-Mendez CR, Hakomori S (1988) Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 and lyso-GM3 in tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 263:10915-10921.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816.
- He X, Wikstrand CJ, Fredman P, Mansson JE, Svennerholm L, Bigner DD (1989) GD3 expression by cultured human tumor cells of neuroectodermal origin. *Acta Neuropathol* 79:317-325.
- Henson JW, Schnitker BL, Correa KM, von DA, Fassbender F, Xu HJ, Benedict WF, Yandell DW, Louis DN (1994) The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas. *Ann Neurol* 36:714-721.
- Higa HH, Manzi A, Varki A (1989) O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids. Purification, characterization, and properties of a glycosylated rat liver esterase specific for 9-O-acetylated sialic acids. *J Biol Chem* 264:19435-19442.
- Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 15:2672-2681.
- Hitoshi S, Kusunoki S, Kon K, Chiba A, Waki H, Ando S, Kanazawa I (1996) A novel ganglioside, 9-O-acetyl GD1b, is recognized by serum antibodies in Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol* 66:95-101.
- Hoon DS, Irie RF, Cochran AJ (1988) Gangliosides from human melanoma immunomodulate response of T cells to interleukin-2. *Cell Immunol* 111:410-419.
- Hu B, Jarzynka MJ, Guo P, Imanishi Y, Schlaepfer DD, Cheng SY (2006) Angiopoietin 2 induces glioma cell invasion by stimulating matrix metalloprotease 2 expression through the $\alpha v \beta 1$ integrin and focal adhesion kinase signaling pathway. *Cancer Res* 66:775-783.
- Huang PH, Xu AM, White FM (2009) Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci Signal* 2:re6.
- Hubl U, Ishida H, Kiso M, Hasegawa A, Schauer R (2000) Studies on the specificity and sensitivity of the influenza C virus binding assay for 9-O-acetylated sialic acids and its application to human melanomas. *J Biochem* 127:1021-1031.
- Hulleman E, Boonstra J (2001) Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 58:80-93.
- Hussain SF, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger AB (2006) The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro Oncol* 8:261-279.
- Hynds DL, Summers M, Van BJ, O'Dorisio MS, Yates AJ (1995) Gangliosides inhibit platelet-derived growth factor-stimulated growth, receptor phosphorylation, and dimerization in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 65:2251-2258.
- Hynes NE, Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5:341-354.
- Icard-Liepkalns C, Liepkalns VA, Yates AJ, Rodriguez ZR, Stephens RE (1982) Effect of exogenous gangliosides on human neural cell division. *J Cell Physiol* 113:186-191.

Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, Schmidt EE, Moshref A, Collins VP (2000) Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res* 60:417-424.

Igarashi M, Waki H, Saito S, Komiya Y, Ando S (1994) Characteristics of gangliosides including O-acetylated species in growth cone membranes at several developmental stages in rat forebrain. *Brain Res Dev Brain Res* 78:17-24.

Irani DN, Lin KI, Griffin DE (1996) Brain-derived gangliosides regulate the cytokine production and proliferation of activated T cells. *J Immunol* 157:4333-4340.

Iwabuchi K, Yamamura S, Prinetti A, Handa K, Hakomori S (1998) GM3-enriched microdomain involved in cell adhesion and signal transduction through carbohydrate-carbohydrate interaction in mouse melanoma B16 cells. *J Biol Chem* 273:9130-9138.

J.M.Coteron KSJLAMD-DAF-MJJ-BMM-LMN-S (1995) Oligosaccharides Structurally Related to E-Selectin Ligands Are Inhibitors of Neural Cell Division: Synthesis, Conformational Analysis, and Biological Activity. *The Journal of Organic Chemistry* 60:1502-1519.

Jacob D, Davis J, Fang B (2004) Xenograftic tumor models in mice for cancer research, a technical review. *Gene Ther Mol Biol* 8:213-219.

James CD, Carlbohm E, Dumanski JP, Hansen M, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK (1988) Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res* 48:5546-5551.

Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B (1994) Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 54:6353-6358.

Jessell TM, Hynes MA, Dodd J (1990) Carbohydrates and carbohydrate-binding proteins in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 13:227-255.

Johns TG, Luwor RB, Murone C, Walker F, Weinstock J, Vitali AA, Perera RM, Jungbluth AA, Stockert E, Old LJ, Nice EC, Burgess AW, Scott AM (2003) Antitumor efficacy of cytotoxic drugs and the monoclonal antibody 806 is enhanced by the EGF receptor inhibitor AG1478. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15871-15876.

Juliano RL (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:283-323.

Kamerling JP, Schauer R, Shukla AK, Stoll S, van HH, Vliegthart JF (1987) Migration of O-acetyl groups in N,O-acetylneuraminic acids. *Eur J Biochem* 162:601-607.

Kanu OO, Mehta A, Di C, Lin N, Bortoff K, Bigner DD, Yan H, Adamson DC (2009) Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 13:701-718.

Kanzawa T, Germano IM, Kondo Y, Ito H, Kyo S, Kondo S (2003) Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. *Br J Cancer* 89:922-929.

Kapoor GS, O'Rourke DM (2003) Receptor tyrosine kinase signaling in gliomagenesis: pathobiology and therapeutic approaches. *Cancer Biol Ther* 2:330-342.

Kawada M, Yamagoe S, Murakami Y, Suzuki K, Mizuno S, Uehara Y (1997) Induction of p27Kip1 degradation and anchorage independence by Ras through the MAP kinase signaling pathway. *Oncogene* 15:629-637.

Kawashima I, Nagata I, Tai T (1996) Immunocytochemical analysis of gangliosides in rat primary cerebellar cultures using specific monoclonal antibodies. *Brain Res* 732:75-86.

Khazaie K, Schirmacher V, Lichtner RB (1993) EGF receptor in neoplasia and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 12:255-274.

Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J (1997) Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J* 16:2783-2793.

Kim SU, Moretto G, Lee V, Yu RK (1986) Neuroimmunology of gangliosides in human neurons and glial cells in culture. *J Neurosci Res* 15:303-321.

Kitagawa M, Higashi H, Jung HK, Suzuki-Takahashi I, Ikeda M, Tamai K, Kato J, Segawa K, Yoshida E, Nishimura S, Taya Y (1996) The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different from that for phosphorylation by cyclin A/E-Cdk2. *EMBO J* 15:7060-7069.

Klenk E (1942) Über die ganglioside, eine neue gruppe von zuckerhaltigen gehirnlipoiden. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 273:76-86.

Koochekpour S, Jeffers M, Rulong S, Taylor G, Klineberg E, Hudson EA, Resau JH, Vande Woude GF (1997) Met and hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human gliomas. *Cancer Res* 57:5391-5398.

Koochekpour S, Pilkington GJ (1996) Vascular and perivascular GD3 expression in human glioma. *Cancer Lett* 104:97-102.

Kopitz J, Muhl C, Ehemann V, Lehmann C, Cantz M (1997) Effects of cell surface ganglioside sialidase inhibition on growth control and differentiation of human neuroblastoma cells. *Eur J Cell Biol* 73:1-9.

Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60:619-642.

Ladisch S, Chang F, Li R, Cogen P, Johnson D (1997) Detection of medulloblastoma and astrocytoma-associated ganglioside GD3 in cerebrospinal fluid. *Cancer Lett* 120:71-78.

Lampert K, Machein U, Machein MR, Conca W, Peter HH, Volk B (1998) Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors. *Am J Pathol* 153:429-437.

Lauren J, Gunji Y, Alitalo K (1998) Is angiopoietin-2 necessary for the initiation of tumor angiogenesis? *Am J Pathol* 153:1333-1339.

Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271:20608-20616.

Learn CA, Hartzell TL, Wikstrand CJ, Archer GE, Rich JN, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Sampson JH (2004) Resistance to tyrosine kinase inhibition by mutant epidermal growth factor receptor variant III contributes to the neoplastic phenotype of glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 10:3216-3224.

Lee MH, Reynisdottir I, Massague J (1995) Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9:639-649.

Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y (1999) Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 4:1029-1040.

Li W, Nishimura R, Kashishian A, Batzer AG, Kim WJ, Cooper JA, Schlessinger J (1994) A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 14:509-517.

Lipinski MM, Jacks T (1999) The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene* 18:7873-7882.

Liu JJ, Chao JR, Jiang MC, Ng SY, Yen JJ, Yang-Yen HF (1995) Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 15:3654-3663.

Liu Y, Li R, Ladisch S (2004) Exogenous ganglioside GD1a enhances epidermal growth factor receptor binding and dimerization. *J Biol Chem* 279:36481-36489.

Louis DN (1994) The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 53:11-21.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (2007a) WHO Classification of tumours of the central nervous system. International Agency for Research on Cancer (IARC).

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007b) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97-109.

Lui VW, Grandis JR (2002) EGFR-mediated cell cycle regulation. *Anticancer Res* 22:1-11.

Lund-Johansen M, Bjerkvig R, Humphrey PA, Bigner SH, Bigner DD, Laerum OD (1990) Effect of epidermal growth factor on glioma cell growth, migration, and invasion in vitro. *Cancer Res* 50:6039-6044.

Ma R, Koulov A, Moulton C, Basu M, Banerjee S, Goodson H, Basu S (2004) Apoptosis of human breast carcinoma cells in the presence of disialosyl gangliosides: II. Treatment of SKBR3 cells with GD3 and GD1b gangliosides. *Glycoconj J* 20:319-330.

Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A, Eshraghi M, Manda KD, Wiechec E, Los M (2007) Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat* 10:13-29.

Maier EA, Brennan C, Wen PY, Durso L, Ligon KL, Richardson A, Khatry D, Feng B, Sinha R, Louis DN, Quackenbush J, Black PM, Chin L, DePinho RA (2006) Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. *Cancer Res* 66:11502-11513.

Malumbres M, Barbacid M (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30:630-641.

Manfredi MG, Lim S, Claffey KP, Seyfried TN (1999) Gangliosides influence angiogenesis in an experimental mouse brain tumor. *Cancer Res* 59:5392-5397.

Martens T, Laabs Y, Gunther HS, Kemming D, Zhu Z, Witte L, Hagel C, Westphal M, Lamszus K (2008) Inhibition of glioblastoma growth in a highly invasive nude mouse model can be achieved by targeting epidermal growth factor receptor but not vascular endothelial growth factor receptor-2. *Clin Cancer Res* 14:5447-5458.

Martinvalet D, Dykxhoorn DM, Ferrini R, Lieberman J (2008) Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell* 133:681-692.

Massague J (1983) Epidermal growth factor-like transforming growth factor. II. Interaction with epidermal growth factor receptors in human placenta membranes and A431 cells. *J Biol Chem* 258:13614-13620.

Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ (1995) p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9:650-662.

Mayo LD, Donner DB (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11598-11603.

McKerracher L (2002) Ganglioside rafts as MAG receptors that mediate blockade of axon growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7811-7813.

Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM (2000) AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404:782-787.

Merzak A, McCrea S, Koocheckpour S, Pilkington GJ (1994) Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta 1. *Br J Cancer* 70:199-203.

Meuillet E, Cremel G, Dreyfus H, Hicks D (1996) Differential modulation of basic fibroblast and epidermal growth factor receptor activation by ganglioside GM3 in cultured retinal Muller glia. *Glia* 17:206-216.

Miletic H, Niclou SP, Johansson M, Bjerkvig R (2009) Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms. *Expert Opin Ther Targets* 13:455-468.

Miljan EA, Bremer EG (2002) Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci STKE* 2002:RE15.

Miljan EA, Meuillet EJ, Mania-Farnell B, George D, Yamamoto H, Simon HG, Bremer EG (2002) Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. *J Biol Chem* 277:10108-10113.

- Mirkin BL, Clark SH, Zhang C (2002) Inhibition of human neuroblastoma cell proliferation and EGF receptor phosphorylation by gangliosides GM1, GM3, GD1A and GT1B. *Cell Prolif* 35:105-115.
- Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA, Ji XD, Suvarna P, Volland JR, Old LJ, Huang HJ, Cavenee WK (2001) Growth suppression of intracranial xenografted glioblastomas overexpressing mutant epidermal growth factor receptors by systemic administration of monoclonal antibody (mAb) 806, a novel monoclonal antibody directed to the receptor. *Cancer Res* 61:5349-5354.
- Mitsuda T, Furukawa K, Fukumoto S, Miyazaki H, Urano T, Furukawa K (2002) Overexpression of ganglioside GM1 results in the dispersion of platelet-derived growth factor receptor from glycolipid-enriched microdomains and in the suppression of cell growth signals. *J Biol Chem* 277:11239-11246.
- Mittnacht S, Lees JA, Desai D, Harlow E, Morgan DO, Weinberg RA (1994) Distinct sub-populations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation. *EMBO J* 13:118-127.
- Miyashita T, Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-299.
- Mohanam S, Chintala SK, Go Y, Bhattacharya A, Venkaiah B, Boyd D, Gokaslan ZL, Sawaya R, Rao JS (1997) In vitro inhibition of human glioblastoma cell line invasiveness by antisense uPA receptor. *Oncogene* 14:1351-1359.
- Mohanam S, Sawaya RE, Yamamoto M, Bruner JM, Nicholson GL, Rao JS (1994) Proteolysis and invasiveness of brain tumors: role of urokinase-type plasminogen activator receptor. *J Neurooncol* 22:153-160.
- Montgomery RB, Moscatello DK, Wong AJ, Cooper JA, Stahl WL (1995) Differential modulation of mitogen-activated protein (MAP) kinase/extracellular signal-related kinase kinase and MAP kinase activities by a mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 270:30562-30566.
- Mori M, Uchida M, Watanabe T, Kirito K, Hatake K, Ozawa K, Komatsu N (2003) Activation of extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 induces Bcl-xL up-regulation via inhibition of caspase activities in erythropoietin signaling. *J Cell Physiol* 195:290-297.
- Morisaki H, Fujimoto A, Ando A, Nagata Y, Ikeda K, Nakanishi M (1997) Cell cycle-dependent phosphorylation of p27 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor by cyclin E/Cdk2. *Biochem Biophys Res Commun* 240:386-390.
- Moriyama T, Kataoka H, Seguchi K, Tsubouchi H, Kono M (1996) Effects of hepatocyte growth factor (HGF) on human glioma cells in vitro: HGF acts as a motility factor in glioma cells. *Int J Cancer* 66:678-685.
- Morrison RS, Yamaguchi F, Bruner JM, Tang M, McKeehan W, Berger MS (1994) Fibroblast growth factor receptor gene expression and immunoreactivity are elevated in human glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 54:2794-2799.
- Murakami K, Asou H, Adachi T, Takagi T, Kunimoto M, Saito H, Uyemura K (1999) Neutral glycolipid and ganglioside composition of type-1 and type-2 astrocytes from rat cerebral hemisphere. *J Neurosci Res* 55:382-393.
- Nakatsuji Y, Miller RH (2001) Selective cell-cycle arrest and induction of apoptosis in proliferating neural cells by ganglioside GM3. *Exp Neurol* 168:290-299.
- New DC, Wong YH (2003) CC chemokine receptor-coupled signalling pathways. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 35:779-788.
- Nieto-Sampedro M (1988) Astrocyte mitogen inhibitor related to epidermal growth factor receptor. *Science* 240:1784-1786.
- Nieto-Sampedro M, Bailon C, Fernandez-Mayoralas A, Martin-Lomas M, Mellstrom B, Naranjo JR (1996) Experimental brain glioma: growth arrest and destruction by a blood-group-related tetrasaccharide. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:169-177.
- Nieto-Sampedro M, Broderick JT (1989) A soluble brain molecule related to epidermal growth factor receptor is a mitogen inhibitor for astrocytes. *J Neurosci Res* 22:28-35.

- Nieto-Sampedro M, Gomez-Pinilla F, Knauer DJ, Broderick JT (1988) Epidermal growth factor receptor immunoreactivity in rat brain astrocytes. Response to injury. *Neurosci Lett* 91:276-282.
- Nojiri H, Stroud M, Hakomori S (1991) A specific type of ganglioside as a modulator of insulin-dependent cell growth and insulin receptor tyrosine kinase activity. Possible association of ganglioside-induced inhibition of insulin receptor function and monocytic differentiation induction in HL-60 cells. *J Biol Chem* 266:4531-4537.
- Noll EN, Lin J, Nakatsuji Y, Miller RH, Black PM (2001) GM3 as a novel growth regulator for human gliomas. *Exp Neurol* 168:300-309.
- Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM (1994) Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372:570-573.
- Nyati MK, Morgan MA, Feng FY, Lawrence TS (2006) Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. *Nat Rev Cancer* 6:876-885.
- Offner H, Thieme T, Vandenbark AA (1987) Gangliosides induce selective modulation of CD4 from helper T lymphocytes. *J Immunol* 139:3295-3305.
- Ogura H, Furuhashi K, Sato S, Anazawa K, Itoh M, Shitori Y (1987) Synthesis of 9-O-acetyl- and 4-O-acetyl-sialic acids. *Carbohydr Res* 167:77-86.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutolf UM, Kleihues P (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64:6892-6899.
- Ohgaki H, Kleihues P (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 170:1445-1453.
- Ohtsubo M, Theodoras AM, Schumacher J, Roberts JM, Pagano M (1995) Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol* 15:2612-2624.
- Orskov F, Orskov I, Sutton A, Schneerson R, Lin W, Egan W, Hoff GE, Robbins JB (1979) Form variation in *Escherichia coli* K1: determined by O-acetylation of the capsular polysaccharide. *J Exp Med* 149:669-685.
- Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del SG, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M (1995) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269:682-685.
- Pardee AB (1989) G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 246:603-608.
- Parney IF, Hao C, Petruk KC (2000) Glioma immunology and immunotherapy. *Neurosurgery* 46:778-791.
- Parsons DW, et al. (2008) An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321:1807-1812.
- Pedersen PH, Ness GO, Engebraaten O, Bjerkvig R, Lillehaug JR, Laerum OD (1994) Heterogeneous response to the growth factors [EGF, PDGF (bb), TGF-alpha, bFGF, IL-2] on glioma spheroid growth, migration and invasion. *Int J Cancer* 56:255-261.
- Pettmann B, Manthorpe M, Varon S (1988) Ganglioside GM1 actions on cell-substratum adhesion and DNA synthesis by cultured astroglial cells. *J Neurosci Res* 20:442-450.
- Pines J (2006) Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends Cell Biol* 16:55-63.
- Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, Risau W (1994) Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int J Cancer* 59:520-529.
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A (1994a) p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8:9-22.

- Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J (1994b) Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78:59-66.
- Pore N, Liu S, Haas-Kogan DA, O'Rourke DM, Maity A (2003) PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal VEGF promoter. *Cancer Res* 63:236-241.
- Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM (1997) Expression of cell-cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 3:222-225.
- Portoukalian J, David MJ, Gain P, Richard M (1993) Shedding of GD2 ganglioside in patients with retinoblastoma. *Int J Cancer* 53:948-951.
- Preusser M, Haberler C, Hainfellner JA (2006) Malignant glioma: neuropathology and neurobiology. *Wien Med Wochenschr* 156:332-337.
- Rasband W (2008) ImageJ 1.38x. ImageJ, U S National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, [://rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/).
- Ravindranath MH, Gonzales A, Soh D, Nishimoto K, Tam WY, Bilchik A, Morton DL, O'Day S (2001) Interleukin-2 binds to ganglioside GD(1b). *Biochem Biophys Res Commun* 283:369-373.
- Reardon DA, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Friedman AH, Desjardins A, Sathornsumetee S, Herndon JE, Dowell JM, McLendon RE, Provenzale JM, Sampson JH, Smith RP, Swaisland AJ, Ochs JS, Lyons P, Tourt-Uhlig S, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN (2006) Phase 1 trial of gefitinib plus sirolimus in adults with recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 12:860-868.
- Rebbaa A, Chou PM, Bremer EG (2004) Modulation of Growth Factor response in brain tumors by complex carbohydrates. *Bull Cancer* 91:E15-E60.
- Rebbaa A, Hurh J, Yamamoto H, Kersey DS, Bremer EG (1996) Ganglioside GM3 inhibition of EGF receptor mediated signal transduction. *Glycobiology* 6:399-406.
- Reed SI (1997) Control of the G1/S transition. *Cancer Surv* 29:7-23.
- Reich R, Thompson EW, Iwamoto Y, Martin GR, Deason JR, Fuller GC, Miskin R (1988) Effects of inhibitors of plasminogen activator, serine proteinases, and collagenase IV on the invasion of basement membranes by metastatic cells. *Cancer Res* 48:3307-3312.
- Reifenberger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP (1993) Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 53:2736-2739.
- Reifenberger G, Reifenberger J, Ichimura K, Meltzer PS, Collins VP (1994) Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res* 54:4299-4303.
- Resnicoff M, Burgaud JL, Rotman HL, Abraham D, Baserga R (1995) Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors. *Cancer Res* 55:3739-3741.
- Rio C, Perez-Cerda F, Matute C, Nieto-Sampedro M (1995) Preparation of a monoclonal antibody to a glycidic epitope of the epidermal growth factor receptor that recognizes inhibitors of astrocyte proliferation and reactive microglia. *J Neurosci Res* 40:776-786.
- Ritter G, Boosfeld E, Calves MJ, Oettgen HF, Old LJ, Livingston PO (1990) Antibody response to immunization with purified GD3 ganglioside and GD3 derivatives (lactones, amide and gangliosidol) in the mouse. *Immunobiology* 182:32-43.
- Rivard N, L'Allemain G, Bartek J, Pouyssegur J (1996) Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J Biol Chem* 271:18337-18341.

Rogers GN, Herrler G, Paulson JC, Klenk HD (1986) Influenza C virus uses 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid as a high affinity receptor determinant for attachment to cells. *J Biol Chem* 261:5947-5951.

Rojas M, Yao S, Lin YZ (1996) Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor. *J Biol Chem* 271:27456-27461.

Romero-Ramirez L, Nieto-Sampedro M (2004) Inhibiting human astrocytoma growth: structure-activity relationships in neurostatin related glycolipids. *J Med Chem* 47:4983-4984.

Ruan S, Lloyd KO (1992) Glycosylation pathways in the biosynthesis of gangliosides in melanoma and neuroblastoma cells: relative glycosyltransferase levels determine ganglioside patterns. *Cancer Res* 52:5725-5731.

Rusnati M, Tanghetti E, Urbinati C, Tulipano G, Marchesini S, Ziche M, Presta M (1999) Interaction of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) with free gangliosides: biochemical characterization and biological consequences in endothelial cell cultures. *Mol Biol Cell* 10:313-327.

Russell SJ, Ye YW, Waber PG, Shuford M, Schold SC, Jr., Nisen PD (1995) p53 mutations, O6-alkylguanine DNA alkyltransferase activity, and sensitivity to procarbazine in human brain tumors. *Cancer* 75:1339-1342.

Sachinidis A, Kraus R, Seul C, Meyer zu Brickwedde MK, Schulte K, Ko Y, Hoppe J, Vetter H (1996) Gangliosides GM1, GM2 and GM3 inhibit the platelet-derived growth factor-induced signalling transduction pathway in vascular smooth muscle cells by different mechanisms. *Eur J Cell Biol* 71:79-88.

Salcini AE, McGlade J, Pelicci G, Nicoletti I, Pawson T, Pelicci PG (1994) Formation of Shc-Grb2 complexes is necessary to induce neoplastic transformation by overexpression of Shc proteins. *Oncogene* 9:2827-2836.

Sampson JH, Crotty LE, Lee S, Archer GE, Ashley DM, Wikstrand CJ, Hale LP, Small C, Dranoff G, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD (2000) Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7503-7508.

Santos-Benito FF, Fernandez-Mayoralas A, Martin-Lomas M, Nieto-Sampedro M (1992) Inhibition of proliferation of normal and transformed neural cells by blood group-related oligosaccharides. *J Exp Med* 176:915-918.

Sawaya RE, Yamamoto M, Gokaslan ZL, Wang SW, Mohanam S, Fuller GN, McCutcheon IE, Stetler-Stevenson WG, Nicolson GL, Rao JS (1996) Expression and localization of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) in human malignant gliomas in vivo. *Clin Exp Metastasis* 14:35-42.

Sbaschnig-Agler M, Dreyfus H, Norton WT, Sensenbrenner M, Farooq M, Byrne MC, Ledeen RW (1988) Gangliosides of cultured astroglia. *Brain Res* 461:98-106.

Schlegel U, Moots PL, Rosenblum MK, Thaler HT, Furneaux HM (1990) Expression of transforming growth factor alpha in human gliomas. *Oncogene* 5:1839-1842.

Schulze WX, Deng L, Mann M (2005) Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol Syst Biol* 1:2005.

Schwartz GK, Shah MA (2005) Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol* 23:9408-9421.

Scott AM, et al. (2007) A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4071-4076.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366:704-707.

Sherr CJ (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* 79:551-555.

Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-1677.

Sherr CJ, Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-1163.

- Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501-1512.
- Shi M, Yan SG, Xie ST, Wang HN (2008) Tip30-induced apoptosis requires translocation of Bax and involves mitochondrial release of cytochrome c and Smac/DIABLO in hepatocellular carcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1783:263-274.
- Shi WX, Chammas R, Varki NM, Powell L, Varki A (1996) Sialic acid 9-O-acetylation on murine erythroleukemia cells affects complement activation, binding to I-type lectins, and tissue homing. *J Biol Chem* 271:31526-31532.
- Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, Arteaga CL (2002) PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8:1145-1152.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845.
- Sibenaller ZA, Etame AB, Ali MM, Barua M, Braun TA, Casavant TL, Ryken TC (2005) Genetic characterization of commonly used glioma cell lines in the rat animal model system. *Neurosurg Focus* 19:E1.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K (1994) Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10:405-455.
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Singh AB, Harris RC (2005) Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* 17:1183-1193.
- Sitrin RG, Gyetko MR, Kole KL, McKeever P, Varani J (1990) Expression of heterogeneous profiles of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors by human glioma lines. *Cancer Res* 50:4957-4961.
- Sjoberg ER, Manzi AE, Khoo KH, Dell A, Varki A (1992) Structural and immunological characterization of O-acetylated GD2. Evidence that GD2 is an acceptor for ganglioside O-acetyltransferase in human melanoma cells. *J Biol Chem* 267:16200-16211.
- Sjoberg ER, Powell LD, Klein A, Varki A (1994) Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta can be masked by 9-O-acetylation of sialic acids. *J Cell Biol* 126:549-562.
- Slevin M, Kumar S, He X, Gaffney J (1999) Physiological concentrations of gangliosides GM1, GM2 and GM3 differentially modify basic-fibroblast-growth-factor-induced mitogenesis and the associated signalling pathway in endothelial cells. *Int J Cancer* 82:412-423.
- Soiffer RJ, Chapman PB, Murray C, Williams L, Unger P, Collins H, Houghton AN, Ritz J (1997) Administration of R24 monoclonal antibody and low-dose interleukin 2 for malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 3:17-24.
- Song WX, Vacca MF, Welti R, Rintoul DA (1991) Effects of gangliosides GM3 and De-N-acetyl GM3 on epidermal growth factor receptor kinase activity and cell growth. *J Biol Chem* 266:10174-10181.
- Sonnino S, Cantu L, Corti M, Acquotti D, Venerando B (1994) Aggregative properties of gangliosides in solution. *Chem Phys Lipids* 71:21-45.
- Sonnino S, Ghidoni R, Chigorno V, Tettamanti G (1982) Chemistry of gangliosides carrying o-acetylated sialic acid. *Adv Exp Med Biol* 152:55-69.
- Soos TJ, Kiyokawa H, Yan JS, Rubin MS, Giordano A, DeBlasio A, Bottega S, Wong B, Mendelsohn J, Koff A (1996) Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle. *Cell Growth Differ* 7:135-146.
- Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, Baig G, Goddard C, Gibson NW, Slack JA, . (1987) Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer Res* 47:5846-5852.

Stojiljkovic M, Blagojevic T, Vukosavic S, Zvezdina ND, Pekovic S, Nikezic G, Rakic L (1996) Ganglioside GM1 and GM3 in early human brain development: an immunocytochemical study. *Int J Dev Neurosci* 14:35-44.

Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G (1998) The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 17:5001-5014.

Stupp R, Dietrich PY, Ostermann KS, Pica A, Maillard I, Maeder P, Meuli R, Janzer R, Pizzolato G, Miralbell R, Porchet F, Regli L, de TN, Mirimanoff RO, Leyvraz S (2002) Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 20:1375-1382.

Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987-996.

Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP (1990) Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8602-8606.

Sun P, Wang XQ, Lopatka K, Bangash S, Paller AS (2002) Ganglioside loss promotes survival primarily by activating integrin-linked kinase/Akt without phosphoinositide 3-OH kinase signaling. *J Invest Dermatol* 119:107-117.

Sung CC, Pearl DK, Coons SW, Scheithauer BW, Johnson PC, Zheng M, Yates AJ (1995) Correlation of ganglioside patterns of primary brain tumors with survival. *Cancer* 75:851-859.

Svennerholm L, Rynmark BM, Vilbergsson G, Fredman P, Gottfries J, Mansson JE, Percy A (1991) Gangliosides in human fetal brain. *J Neurochem* 56:1763-1768.

Takayama S, Livingston PO, Wong CH (1996) Synthesis of the melanoma-associated ganglioside 9-O-acetyl GD3 through regioselective enzymatic acetylation of GD3 using subtilisin. *Tetrahedron Letters* 37:9271-9274.

Tate MC, Aghi MK (2009) Biology of angiogenesis and invasion in glioma. *Neurotherapeutics* 6:447-457.

The Cancer Genome Atlas Research Network (2008) Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455:1061-1068.

Toyoshima H, Hunter T (1994) p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78:67-74.

Traylor TD, Hogan EL (1980) Gangliosides of human cerebral astrocytomas. *J Neurochem* 34:126-131.

Treisman R (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 8:205-215.

Tsai JC, Goldman CK, Gillespie GY (1995) Vascular endothelial growth factor in human glioma cell lines: induced secretion by EGF, PDGF-BB, and bFGF. *J Neurosurg* 82:864-873.

Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z, Merriman B, Perlina A, Lee Y, Dia EQ, Yoshimoto K, Mischel PS, Liao LM, Cloughesy TF, Nelson SF (2006) Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res* 66:159-167.

Vallejo-Cremades M (2001) Células de origen y expresión de la neurostatina durante el desarrollo del encéfalo de rata. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid Madrid, España.

Vallejo-Cremades M, Nieto-Sampedro M (2006) Neurostatin: cellular sources and cellular targets of the inhibitor. *Neuron Glia Biol* 2:115-123.

Van Brocklyn J, Bremer EG, Yates AJ (1993) Gangliosides inhibit platelet-derived growth factor-stimulated receptor dimerization in human glioma U-1242MG and Swiss 3T3 cells. *J Neurochem* 61:371-374.

van den Bent MJ, Brandes AA, Rampling R, Kouwenhoven MC, Kros JM, Carpentier AF, Clement PM, Frenay M, Campone M, Baurain JF, Armand JP, Taphoorn MJ, Tosoni A, Kletzl H, Klughammer B, Lacombe D, Gorlia T (2009) Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J Clin Oncol* 27:1268-1274.

van EG, Sandhoff K (1993) Ganglioside metabolism. Enzymology, Topology, and regulation. *J Biol Chem* 268:5341-5344.

Varki A (1992) Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* 2:25-40.

Varki A, Diaz S (1984) The release and purification of sialic acids from glycoconjugates: methods to minimize the loss and migration of O-acetyl groups. *Anal Biochem* 137:236-247.

Varki A, Kornfeld S (1980) An autosomal dominant gene regulates the extent of 9-O-acetylation of murine erythrocyte sialic acids. A probable explanation for the variation in capacity to activate the human alternate complement pathway. *J Exp Med* 152:532-544.

Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2:594-604.

Wagener R, Rohn G, Schillinger G, Schroder R, Kobbe B, Ernestus RI (1999) Ganglioside profiles in human gliomas: quantification by microbore high performance liquid chromatography and correlation to histomorphology and grading. *Acta Neurochir (Wien)* 141:1339-1345.

Waki H, Murata A, Kon K, Maruyama K, Kimura S, Ogura H, Ando S (1993) Isolation and characterization of a trisialyllactosylceramide, GT3, containing an O-acetylated sialic acid in cod fish brain. *J Biochem* 113:502-507.

Wang W, Bu B, Xie M, Zhang M, Yu Z, Tao D (2009) Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Prog Neurobiol* 89:1-17.

Wang X, Sun P, Al-Qamari A, Tai T, Kawashima I, Paller AS (2001) Carbohydrate-carbohydrate binding of ganglioside to integrin $\alpha(5)$ modulates $\alpha(5)\beta(1)$ function. *J Biol Chem* 276:8436-8444.

Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (1996) Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6:217-223.

Watters JJ, Schartner JM, Badie B (2005) Microglia function in brain tumors. *J Neurosci Res* 81:447-455.

Weber JD, Raben DM, Phillips PJ, Baldassare JJ (1997) Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. *Biochem J* 326 (Pt 1):61-68.

Wechsler-Reya R, Scott MP (2001) The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci* 24:385-428.

Westermarck B, Heldin CH, Nister M (1995) Platelet-derived growth factor in human glioma. *Glia* 15:257-263.

Wild-Bode C, Weller M, Wick W (2001) Molecular determinants of glioma cell migration and invasion. *J Neurosurg* 94:978-984.

Xiong Y, Zhang H, Beach D (1993) Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. *Genes Dev* 7:1572-1583.

Yamamoto H, Oviedo A, Sweeley C, Saito T, Moskal JR (2001) $\alpha(2,6)$ -sialylation of cell-surface N-glycans inhibits glioma formation in vivo. *Cancer Res* 61:6822-6829.

Yamamura S, Handa K, Hakomori S (1997) A close association of GM3 with c-Src and Rho in GM3-enriched microdomains at the B16 melanoma cell surface membrane: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun* 236:218-222.

Yamashiro S, Ruan S, Furukawa K, Tai T, Lloyd KO, Shiku H, Furukawa K (1993) Genetic and enzymatic basis for the differential expression of GM2 and GD2 gangliosides in human cancer cell lines. *Cancer Res* 53:5395-5400.

- Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K, Proia RL (1999) A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9142-9147.
- Yamini B, Yu X, Pytel P, Galanopoulos N, Rawlani V, Veerapong J, Bickenbach K, Weichselbaum RR (2007) Adenovirally delivered tumor necrosis factor- α improves the antiglioma efficacy of concomitant radiation and temozolomide therapy. *Clin Cancer Res* 13:6217-6223.
- Yates AJ, Franklin TK, McKinney P, Collins R, Comas T, Boesel CP, Pearl DK (1999) Gangliosides and neutral glycolipids in ependymal, neuronal and primitive neuroectodermal tumors. *J Mol Neurosci* 12:111-121.
- Yates AJ, Rampersaud A (1998) Sphingolipids as receptor modulators. An overview. *Ann N Y Acad Sci* 845:57-71.
- Yates AJ, VanBrocklyn J, Saqr HE, Guan Z, Stokes BT, O'Dorisio MS (1993) Mechanisms through which gangliosides inhibit PDGF-stimulated mitogenesis in intact Swiss 3T3 cells: receptor tyrosine phosphorylation, intracellular calcium, and receptor binding. *Exp Cell Res* 204:38-45.
- Ye JN, Cheung NK (1992) A novel O-acetylated ganglioside detected by anti-GD2 monoclonal antibodies. *Int J Cancer* 50:197-201.
- Yu RK, Macala LJ, Taki T, Weinfield HM, Yu FS (1988) Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain. *J Neurochem* 50:1825-1829.
- Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen MT, Poulsen HS (2007) Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* 19:2013-2023.
- Zeng G, Li DD, Gao L, Birkle S, Bieberich E, Tokuda A, Yu RK (1999) Alteration of ganglioside composition by stable transfection with antisense vectors against GD3-synthase gene expression. *Biochemistry* 38:8762-8769.
- Zervas M, Walkley SU (1999) Ferret pyramidal cell dendritogenesis: changes in morphology and ganglioside expression during cortical development. *J Comp Neurol* 413:429-448.
- Zhang H, Zhang S, Cheung NK, Ragupathi G, Livingston PO (1998) Antibodies against GD2 ganglioside can eradicate syngeneic cancer micrometastases. *Cancer Res* 58:2844-2849.
- Zhou YH, Tan F, Hess KR, Yung WK (2003) The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. *Clin Cancer Res* 9:3369-3375.
- Ziegler-Heitbrock HW, Kafferlein E, Haas JG, Meyer N, Strobel M, Weber C, Flieger D (1992) Gangliosides suppress tumor necrosis factor production in human monocytes. *J Immunol* 148:1753-1758.
- Zou JP, Morford LA, Chougnet C, Dix AR, Brooks AG, Torres N, Shuman JD, Coligan JE, Brooks WH, Roszman TL, Shearer GM (1999) Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. *J Immunol* 162:4882-4892.
- Zurita AR, Maccioni HJ, Daniotti JL (2001) Modulation of epidermal growth factor receptor phosphorylation by endogenously expressed gangliosides. *Biochem J* 355:465-472.

ANEXO I

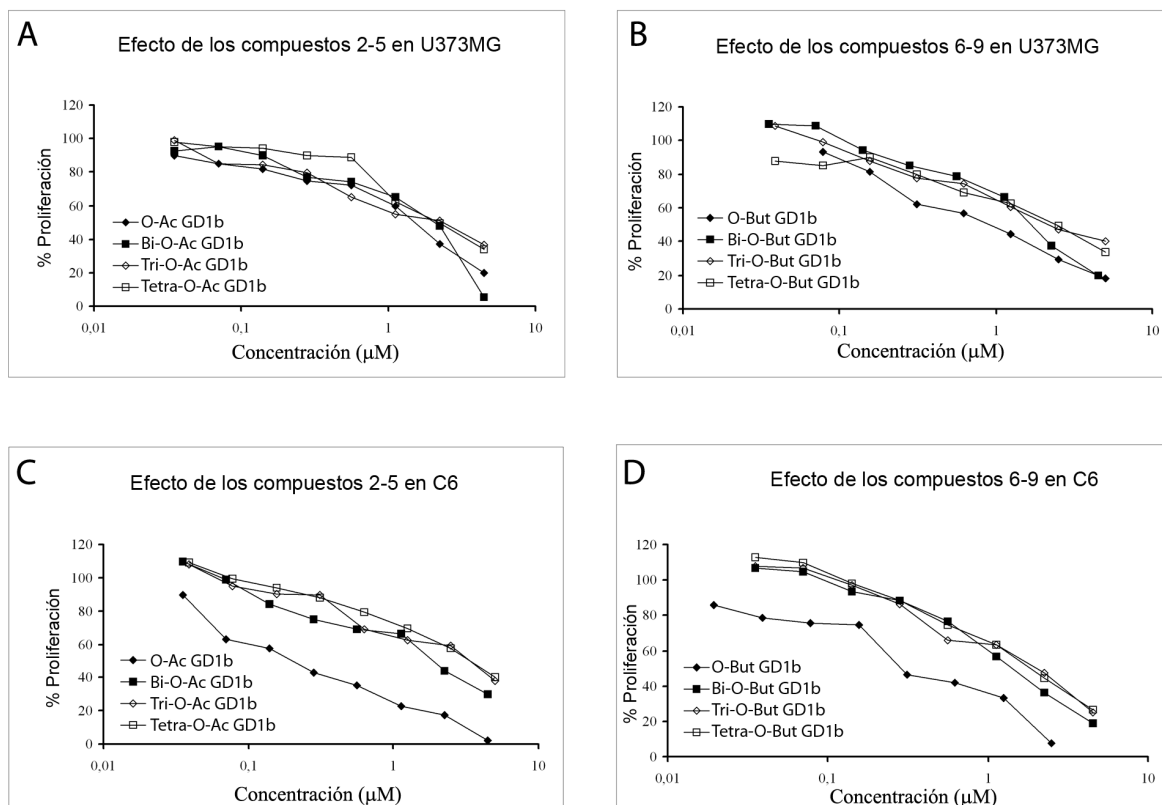


Figura S1. Inhibición de la proliferación de células U373MG o C6 por los gangliósidos O-acetilados y O-butilados derivados de GD1b (2-9).

(A-D) Curvas dosis-respuesta de inhibición de los compuestos semi-sintéticos (2-5) y (6-9) derivados de GD1b, empleando EGF como mitógeno (10ng/ml; t=24h). (A, B) Efecto de los compuestos O-acetilados 2-5 (A) y O-butilados 6-9 (B) sobre la proliferación de la línea de astrocitoma humano U373MG. (C, D) Efecto de los compuestos O-acetilados 2-5 (C) y O-butilados 6-9 (D) sobre la proliferación de la línea de glioblastoma de rata C6. Los compuestos fueron ensayados en diluciones seriadas (5-0.17μM).

Compuesto	LCB	F.A.	M-H	M+Na-H
GD1a/GD1b	18:1	18:0	1836	1859
	20:1	18:0	1864	1887
O-Ac GD1b (NST)	18:1	18:0	1879	1902
	20:1	18:0	1907	1930
Bi-O-Ac GD1b	18:1	18:0	1922	1945
	20:1	18:0	1950	1973
Tri-O-Ac GD1b	18:1	18:0	1965	1988
	20:1	18:0	1993	2016
Tetra-O-Ac GD1b	18:1	18:0	2008	2031
	20:1	18:0	2036	2059
O-But GD1b	18:1	18:0	1906	1929
	20:1	18:0	1934	1957
Bi-O-But GD1b	18:1	18:0	1976	1999
	20:1	18:0	2004	2027
Tri-O-But GD1b	18:1	18:0	2046	2069
	20:1	18:0	2074	2097
Tetra-O-But GD1b	18:1	18:0	2116	2139
	20:1	18:0	2144	2167

Tabla S1. Pesos moleculares teóricos de las especies resultantes de la O-sustitución de GD1b.

Pesos moleculares (m/z) teóricos correspondientes a las especies de GD1b O-acetiladas y O-butiladas, de una a cuatro veces. LCB, cadena de la esfingosina de la ceramida de GD1b, que puede tener 18 o 20 carbonos y una insaturación (18:1 ó 20:1). F.A., ácido graso de la ceramida, con 18 carbonos (18:0). Se muestran los pesos correspondientes a las especies M-H y M+Na-H (aducto sódico). Grupo acetilo, +43 unidades/grupo; grupo butirilo, +70 unidades/grupo.

Simbolo	UniGene	RefSeq	Descripción	Nombre del gen	EGF+NST/EGF	p valor
AKT1	Hs.525622	NM_005163	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT/PKB	-4,475	0,0406
ANGPT1	Hs.369675	NM_001146	Angiopoietin 1	AGP1/AGPT	-1,954	0,0923
ANGPT2	Hs.583870	NM_001147	Angiopoietin 2	AGPT2/ANG2	-4,136	0,0140
APAF1	Hs.552567	NM_001160	Apoptotic peptidase activating factor 1	APAF-1/CED4	-1,582	0,0554
ATM	Hs.367437	NM_000051	Ataxia telangiectasia mutated	AT1/ATA	-1,522	0,0304
BAD	Hs.370254	NM_004322	BCL2-associated agonist of cell death	BBC2/BCL2L8	2,440	0,0015
BAX	Hs.624291	NM_004324	BCL2-associated X protein	BCL2L4	-1,108	0,7449
BCL2	Hs.150749	NM_000633	B-cell CLL/lymphoma 2	Bcl-2	-1,091	0,8086
BCL2L1	Hs.516966	NM_138578	BCL2-like 1	BCL-XL/S	-2,341	0,0230
BRCA1	Hs.194143	NM_007294	Breast cancer 1, early onset	BRCAl/BRCC1	1,308	0,0824
CASP8	Hs.599762	NM_001228	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	ALPS2B/CAP4	-1,057	0,8238
CCNE1	Hs.244723	NM_001238	Cyclin E1	CCNE	-3,539	0,0370
CDC25A	Hs.437705	NM_001789	Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)	CDC25A2	-3,664	0,0115
CDK2	Hs.19192	NM_001798	Cyclin-dependent kinase 2	p33(CDK2)	-2,683	0,0469
CDK4	Hs.95577	NM_000075	Cyclin-dependent kinase 4	CMM3/PSK-J3	-1,229	0,6737
CDKN1A	Hs.370771	NM_000389	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	CAP20/CDKN1	3,158	0,0482
CDKN2A	Hs.512599	NM_000077	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	ARF/CDK4I	3,360	0,0435
CFLAR	Hs.390736	NM_003879	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CASH/CASP8AP1	1,085	0,6783
CHEK2	Hs.291363	NM_007194	CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	CDS1/CHK2	-1,001	0,9980
COL18A1	Hs.517356	NM_030582	Collagen, type XVIII, alpha 1	KNO/KNO1	-1,116	0,8752
E2F1	Hs.654393	NM_005225	E2F transcription factor 1	E2F-1/RBAP1	-3,710	0,0292
ERBB2	Hs.446352	NM_004448	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	CD340/HER-2	-1,345	0,5007
ETS2	Hs.644231	NM_005239	V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	ETS2IT1	1,319	0,2071
FAS	Hs.244139	NM_000043	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	ALPS1A/APO-1	-1,179	0,5044
FGFR2	Hs.533683	NM_000141	Fibroblast growth factor receptor 2	BEK/BFR-1	-1,812	0,2329
FOS	Hs.25647	NM_005252	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	AP-1/C-FOS	-2,459	0,0178
GZMA	Hs.90708	NM_006144	Granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	CTLA3/HFSP	3,303	0,0408
HTATIP2	Hs.90753	NM_006410	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa	CC3/SDR44U1	3,360	0,0435
IFNA1	Hs.37026	NM_024013	Interferon, alpha 1	IFL/IFN	1,958	0,3611
IFNB1	Hs.93177	NM_002176	Interferon, beta 1, fibroblast	IFB/IFF	-1,118	0,8706
IGF1	Hs.160562	NM_000618	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF1A/IGFI	-1,927	0,0959

IL8	Hs.624	NM_000584	Interleukin 8	CXCL8/GCP-1	-1,821	0,4997
ITGA1	Hs.644352	NM_181501	Integrin, alpha 1	CD49a/VLA1	1,528	0,1645
ITGA2	Hs.482077	NM_002203	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	BR/CD49B	-1,433	0,4930
ITGA3	Hs.265829	NM_002204	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	CD49C/GAP-B3	-1,120	0,8491
ITGA4	Hs.694732	NM_000885	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	CD49D/IA4	-1,198	0,6576
ITGAV	Hs.436873	NM_002210	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	CD51/DKFZp686A08142	-1,089	0,7295
ITGB1	Hs.643813	NM_002211	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	CD29/FNRB	-1,658	0,3685
ITGB3	Hs.218040	NM_000212	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	CD61/GP3A	2,003	0,0225
ITGB5	Hs.536663	NM_002213	Integrin, beta 5	FLJ26658	-1,152	0,7501
JUN	Hs.714791	NM_002228	Jun oncogene	AP-1/AP1	-1,453	0,4724
MAP2K1	Hs.145442	NM_002755	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAPKK1/MEK1	-1,707	0,3088
MCAM	Hs.599039	NM_006500	Melanoma cell adhesion molecule	CD146/MUC18	-1,130	0,7438
MDM2	Hs.484551	NM_002392	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)	HDMX/hdm2	-1,314	0,2459
MET	Hs.132966	NM_000245	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	AUTS9/HGFR	-2,300	0,0239
MMP1	Hs.83169	NM_002421	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	CLG/CLGN	1,718	0,4287
MMP2	Hs.513617	NM_004530	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	CLG4/CLG4A	-3,181	0,0250
MMP9	Hs.297413	NM_004994	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	CLG4B/GELB	1,215	0,7450
MTA1	Hs.525629	NM_004689	Metastasis associated 1	Mta-1	-1,272	0,5464
MTA2	Hs.173043	NM_004739	Metastasis associated 1 family, member 2	DKFZp686F2281/MTA1L1	-1,263	0,5528
MTSS1	Hs.700429	NM_014751	Metastasis suppressor 1	DKFZp781P2223/MIM	1,749	0,0437
MYC	Hs.202453	NM_002467	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	MRTL/bHLHe39	-3,739	0,0340
NFKB1	Hs.654408	NM_003998	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	DKFZp686C01211/EBP-1	-1,163	0,7603
NFKBIA	Hs.81328	NM_020529	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	IKBA/MAD-3	1,387	0,0410
NME1	Hs.118638	NM_000269	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	AWD/GAAD	-1,193	0,6371
NME4	Hs.9235	NM_005009	Non-metastatic cells 4, protein expressed in	NDPK-D/NM23H4	1,227	0,0128
PDGFA	Hs.535898	NM_002607	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	PDGF-A/PDGF1	-1,230	0,5809
PDGFB	Hs.1976	NM_002608	Platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)	PDGF2/SIS	-3,342	0,0414
PIK3R1	Hs.132225	NM_181504	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)	GRB1/p85	-2,379	0,0200
PLAU	Hs.77274	NM_002658	Plasminogen activator, urokinase	ATF/UPA	-2,837	0,0120
PLAUR	Hs.466871	NM_002659	Plasminogen activator, urokinase receptor	CD87/UPAR	-4,513	0,0347
PNN	Hs.409965	NM_002687	Pinin, desmosome associated protein	DRS/SDK3	-1,609	0,0064

RAF1	Hs.159130	NM_002880	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	CRAF/NS5	-2,421	0,0462
RB1	Hs.408528	NM_000321	Retinoblastoma 1	OSRC/RB	-2,502	0,0051
S100A4	Hs.654444	NM_002961	S100 calcium binding protein A4	18A2/42A	1,945	0,0005
SERPINB5	Hs.55279	NM_002639	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	PI5/maspin	2,642	0,0101
SERPINE1	Hs.414795	NM_000602	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	PAI/PAI-1	-1,203	0,5837
SNCG	Hs.349470	NM_003087	Synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)	BCSG1/SR	1,022	0,9601
SYK	Hs.371720	NM_003177	Spleen tyrosine kinase	DKFZp313N1010	3,360	0,0345
TEK	Hs.89640	NM_000459	TEK tyrosine kinase, endothelial	CD202B/TIE-2	-1,125	0,8674
TERT	Hs.492203	NM_198253	Telomerase reverse transcriptase	EST2/TCS1	1,851	0,1407
TGFB1	Hs.645227	NM_000660	Transforming growth factor, beta 1	CED/DPD1	-1,127	0,7822
TGFBR1	Hs.494622	NM_004612	Transforming growth factor, beta receptor 1	AAT5/ACVRLK4	-1,524	0,2818
THBS1	Hs.164226	NM_003246	Thrombospondin 1	THBS/THBS-1	-2,223	0,0132
TIMP1	Hs.522632	NM_003254	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	CLGI/EPA	2,481	0,0275
TIMP3	Hs.644633	NM_000362	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	HSMRK222/K222	3,496	0,0413
TNF	Hs.241570	NM_000594	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	DIF/TNF-alpha	1,894	0,1403
TNFRSF10B	Hs.521456	NM_003842	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	CD262/DR5	-2,619	0,0081
TNFRSF1A	Hs.279594	NM_001065	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	CD120a/FPF	-1,684	0,6977
TNFRSF25	Hs.462529	NM_003790	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	APO-3/DDR3	1,096	0,7590
TP53	Hs.654481	NM_000546	Tumor protein p53	LFS1/TRP53	-1,180	0,3607
TWIST1	Hs.66744	NM_000474	Twist homolog 1 (Drosophila)	ACS3/BPES2	-1,052	0,9050
EPDR1	Hs.563491	NM_017549	Ependymin related protein 1 (zebrafish)	EPDR/MERP-1	-1,387	0,5141
VEGFA	Hs.73793	NM_003376	Vascular endothelial growth factor A	MVCD1/VEGF	-2,596	0,0213

Tabla S2. Identificación y niveles de expresión de las moléculas analizadas por arrays de PCR.

Símbolo, identificación en UniGene y RefSeq (Genbank), descripción, nombre y expresión relativa (EGF+NST/EGF), de las moléculas analizadas mediante arrays de PCR, respectivamente. Los valores correspondientes a sobreexpresión se resaltan en azul, y los de reducción de la expresión en rojo. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se muestran en verde.

ANEXO II

Accepted Manuscript

Title: Synthesis and characterization of neurostatin-related compounds with high inhibitory activity of glioma growth

Authors: Beatriz Valle-Argos, Diego Gómez-Nicola, Manuel Nieto-Sampedro



PII: S0223-5234(10)00059-0

DOI: [10.1016/j.ejmech.2010.01.015](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.01.015)

Reference: EJMECH 3965

To appear in: *European Journal of Medicinal Chemistry*

Received Date: 28 October 2009

Revised Date: 4 January 2010

Accepted Date: 10 January 2010

Please cite this article as: B. Valle-Argos, D. Gómez-Nicola, M. Nieto-Sampedro. Synthesis and characterization of neurostatin-related compounds with high inhibitory activity of glioma growth, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2010), doi: 10.1016/j.ejmech.2010.01.015

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

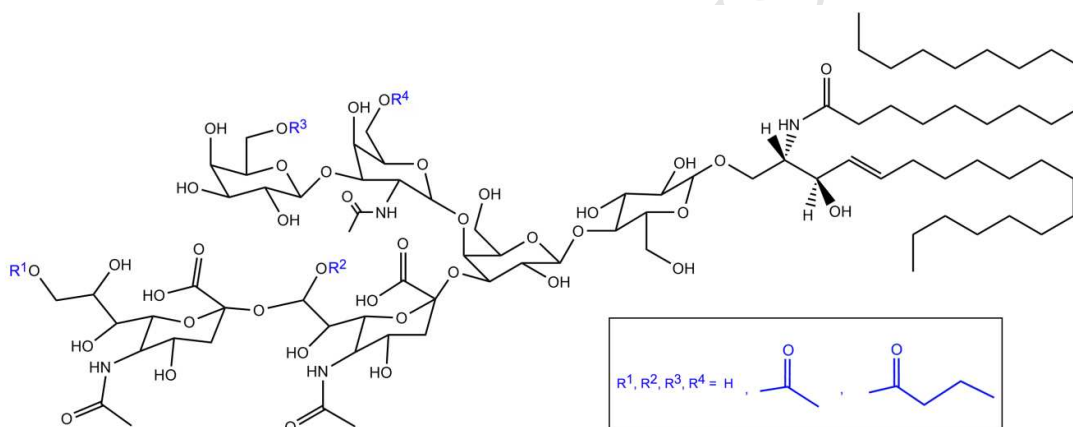
Synthesis and characterization of neurostatin-related compounds with high inhibitory activity of glioma growth

Beatriz Valle-Argos ^a, Diego Gómez-Nicola ^{a,b} and Manuel Nieto-Sampedro ^{a,b,*}.

- a. Neural Plasticity Group. Functional and Systems Neurobiology Department. Cajal Institute (CSIC). Avda Doctor Arce, 37. 28002. Madrid. Spain
b. Experimental Neurology Unit. National Hospital of Paraplegics (SESCAM). Finca La Peraled S/N. 45071. Toledo. Spain

Summary:

New Neurostatin-related compounds, obtained by chemical O-acetylation or O-butyrylation of GD1b, with inhibitory activity of glioma growth.



Synthesis and characterization of neurostatin-related compounds with high inhibitory activity of glioma growth

Beatriz Valle-Argos ^a, Diego Gómez-Nicola ^{a,b} and Manuel Nieto-Sampedro ^{a,b,*}.

- a. Neural Plasticity Group. Functional and Systems Neurobiology Department. Cajal Institute (CSIC). Avda Doctor Arce, 37. 28002. Madrid. Spain
- b. Experimental Neurology Unit. National Hospital of Paraplegics (SESCAM). Finca La Peraleda S/N. 45071. Toledo. Spain

* Corresponding Author:
Manuel Nieto Sampedro
Neural Plasticity Group
Cajal Institute (CSIC)
Avda. Doctor Arce, 37
28002 Madrid
SPAIN
Phone. +34 915854720
FAX. +34 915854754
e-mail. mns@cajal.csic.es

Abstract

O-acetyl-ganglioside neurostatin, (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[9-O-Ac Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide), is a natural GD1b-derived inhibitor of astroblast and astrocytoma division, whose structure and purification method limits its availability and stability. Therefore, we set-up the reaction to obtain O-acetylated and O-butyrylated neurostatin analogs by chemical synthesis, in order to improve its availability and stability. The compounds anti-tumoral activity was evaluated on U373MG and C6 glioblastoma cells, obtaining that the O-acetylation-dependent increase in the inhibitory activity was enhanced by O-butyrylation, with no further improvement with the multi-substitution, pointing to the initial conformational change and the stability change as responsible of its function. These results open the possibility for the application of the neurostatin-related compounds to *in-vivo* tumoral models.

Keywords: Neurostatin, O-But GD1b, O-acetylation, O-butyrylation, glioma, CNS.

Abbreviations: TMOA, trimethyl orthoacetate; TLC, thin layer chromatography; ID50, inhibitory dose 50.

1. Introduction

Glioblastomas are the most frequent primary brain tumors, presenting high proliferative rates and poor prognosis. The treatment of malignant glioblastoma has yielded only meager increases in survival time, inspite of advances in therapeutic oncology. Recent data indicate that only half of the patients that received any treatment in the US, survived one year after the tumor diagnosis [1,2]. The elevated frequency of multiform glioblastomas and astrocytomas make the search for compounds that reduce their progression a research topic of major interest.

Gangliosides are complex glycolipids expressed on the external membrane of vertebrate cells, particularly abundant in CNS, that play essential roles in phenomena ranging from cell-cell recognition [3], cell adhesion [4] or signal transduction [5,6] to cell growth and differentiation [7]. O-acetylation of gangliosides generates compounds with physicochemical and biological properties different from the parent forms [8]. O-acetylation of the sialic acids hydroxyl groups is one of the most common structural modifications of a ganglioside[9]. When O-acetylated in the external sialic acid, ganglioside GD1b becomes a potent natural inhibitor of astroblast and astrocytoma division, called neurostatin (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[9-O-Ac Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide), as first described by our group [10,11]. Moreover, neurostatin presented a reduced inhibitory activity over rat fibroblasts or fibroblast tumor cell lines, showing specificity for cells from the astroglial lineage, thus making it a suitable candidate for the treatment of glial-derived CNS tumors [10,11].

Neurostatin preparation and purification from brain extracts limits the availability and purity of the compound [11,12]. Moreover, the O-acetyl group of neurostatin is very labile to hydrolysis under physiological pH conditions, reducing its activity[11]. These limitations have blocked the application of the compound to *in-vivo* studies or prospective translation to the clinics, as necessary steps during its validation. Therefore, in the present work we propose the use of a semi-synthetic method to obtain neurostatin as an alternative to the purification from brain extracts, in order to increase the yield of obtention and simplify the purification protocols.

We also hypothesized that an O-acyl aliphatic chain longer than acetyl (i.e. butyryl) may lead to neurostatin analogues more resistant to hydrolysis than Neurostatin itself, avoiding the degradation of the group by specific enzymes, as occurring with the natural compound (neurostatin).

Previous results of our group[12] pointed to the O-acetylation as the main responsible of the antitumoral activity observed in natural or synthetic acetylated gangliosides. Therefore, the addition of multiple substitutions to the ganglioside could serve to improve its activity.

Accordingly, we set-up the conditions to obtain O-acetylated and O-butyrylated GD1b derivatives by chemical synthesis. We report here the influence of the number and nature of the O-substitutents on the glioma growth inhibitory activity.

2. Chemistry

Previous studies on the chemical O-acetylation of gangliosides laid the bases to obtain O-acylated disialogangliosides[12,13]. We modified the chemical synthesis method to enhance the production of mono-substituted compounds, or to favor the generation of multi-acylated compounds. We varied both trimethyl orthoacetate (TMOA) molar excess (500-1000) and reaction time (8-48h), in order to improve the efficiency of mono-acetylation. Using the yield of the reaction (percent of mono-substituted band in TLC) as a standard, we found that a molar excess of TMOA of 500, during 8 hours, yielded a 41% of substituted product (Table 1). More restrictive conditions, i.e. reducing reaction time to 4 hours, were not sufficient to permit the reaction.

A temperature variation, ranging from 18 to 25°C, as indicated in the methods section, permitted us to obtain additional reaction products, with higher migration on TLC (Fig. 1, Fig. 2 and Table 2). The acetylation reaction produced four different products (compounds **2-5**) depending on the reaction temperature (Fig. 1A, Fig. 1B, Fig. 1C, Table 2), with defined migration on TLC (R_f values; Table 2). When the reaction was maintained at 18°C, we preferentially obtained a reaction product with R_f between GD1b and GD1a (Fig. 1A; compound **2**), as expected for neurostatin. If the temperature of the reaction was maintained at 21°C, we preferentially obtained compounds **2**, **3** and **4** (Fig. 1B), while an increase to 25°C led to the obtention of compounds **4** and **5** (Fig. 1C). A reaction temperature rise led to the obtention of products with increasing R_f, as an indicative of the compound hydrophobicity gain, probably due to an increase in the number of substitutions inserted in the GD1b structure. Butyrylation reactions were performed in a similar way and the same reaction conditions, yielding also four products (compounds **6-9**), with various R_f values on TLC (Fig. 2; Table 2). When the reaction temperature was maintained at 18°C, we preferentially obtained compounds **6** and **7** (Fig. 2A). If the reaction was produced at 21°C, the obtained products corresponded to compounds **6**, **7** and **8** (Fig. 2B), while an increase to 25°C favoured the obtention of compound **9** (Fig. 2C). These data support the idea of a strict dependence of chemical substitution on reaction time, temperature and molar excess of the substituent. With these conditions, we purified the GD1b-derived compounds shown in Table 3(**2-9**).

Analysis of the compounds structure by MALDI-TOF and electrospray-MS, permitted us to identify the number and localization of the substitutions and establish the dynamics of multiple O-acetylation or O-butyrylation. Chemical acylation of GD1b (compound **1**), permits the sequential substitution of external and internal sialic acid residues (Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α), followed by the external sugars (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β), as indicated by the compound fragmentation pattern (Experimental Protocols; table 6, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6). According to literature, the acyl group is located, in biological conditions, in the 9-position of the α 2-8Neu5Ac [11,12]. These results permitted to identify the GD1b-derived compounds structure as shown in Table 3 (Compounds **2-9**).

3. Biological Evaluation and Discussion

The activity of semi-synthetic O-acetylated and O-butyrylated compounds on the proliferation of human astrocytoma line U373MG and rat glioblastoma multiforme line C6, was compared to that of the unsubstituted compound (compound **1**, GD1b; Table 4) and of temozolomide, an standard inhibitor of glioblastoma growth (TMZ; Table 4). Compound **1** did not inhibit neither U373MG nor C6 division at the maximal concentration tested (50 μ M), in accordance with the previously reported slight mitogenic activity of the ganglioside [12]. The activity of the neurostatin obtained by chemical synthesis (compound **2**) was similar to that previously reported, when purified from brain extracts[12]. It strongly inhibited the growth of both, human and rat glioma lines (ID₅₀ U373MG=2,00 μ M; ID₅₀ C6=0,23 μ M; Table 4).

The inhibitory activity of O-butyrylated GD1b (compound **6**) was higher than that of neurostatin (ID₅₀=0,83 μ M on U373MG; ID₅₀=0,32 μ M on C6 cells; Table 4). These results indicate that the substitution of the external sialic acid of GD1b with a butyryl group (compound **6**) enhanced the antiproliferative activity of the acetylated GD1b (compound **2** [11,12]). Both, compounds **2** and **6** had higher inhibitory activity than the non-glicosidic control temozolomide, being active inhibitors at very low concentrations (nanomolar range).

We found an elevated inhibitory activity on U373MG cells of compounds **3**, **4** and **5** (2,54 μ M, 2,97 μ M, 2,93 μ M, respectively; Table 4) or on C6 cells (1,65 μ M, 3,56 μ M and 4,01 μ M, respectively; Table 4). As for the acetylated products, compounds **7**, **8** and **9** inhibited U373MG cell division with ID₅₀ values of 1,50 μ M, 2,46 μ M and 2,57 μ M, respectively (Table 4), and C6 cell division with ID₅₀ values of 1,31 μ M, 1,74 μ M and 1,88 μ M, respectively (Table 4). Compared to the parent compound (GD1b) or to a classical inhibitor of tumor growth (temozolomide), the GD1b derivatives with multiple acetylations or butyrylations were highly efficient inhibiting tumor cell proliferation.

The comparison among the bi-, tri- or tetra-O-acetylated or O-butyrylated compounds with the mono-substituted ones indicated that the number of substitutions did not improve the inhibitory activity, rather leading to a slight loss of antimitotic activity. The data suggest that the initial substitution that generates compounds **2** or **6**, led to a change in the GD1b ganglioside, directly responsible for the increased antiproliferative activity on U373MG or C6 cells. A shift in the spatial conformation of the ganglioside could explain this fact. In this direction, preliminary modelization results of the compounds structure indicate a rapid conformational change when the first acyl group is inserted, aspect being under current investigation by our group.

In general, O-butyrylated compounds showed higher inhibitory activity than the O-acetylated compounds, both with one or multiple substitutions (Table 4). This difference in biological activity could be based in a differential resistance to hydrolysis of acetylated and butyrylated compounds, so we proceed to analyze the compounds degradation pattern after mild alkaline hydrolysis (Table 5). The hydrolysis rate of compound **2** to GD1b was 11,35% and 41,46% after 5 and 20 minutes of mild alkaline hydrolysis, respectively (Table 5). In contrast, compound **6** was more resistant to hydrolyzation to GD1b, only detectable after 20 minutes

(8,65%). The substitution of the acetyl by a longer aliphatic chain (butyryl) raised the stability of the compound to alkaline hydrolysis, explaining the activity gain observed in the butyrylated compounds.

Previous neurostatin isolation and purification methods have only permitted the evaluation of its anti-tumoral activity under cell culture conditions [10,12]. This situation was bypassed by the design of mimethics like the tetrasaccharide TS4, which showed inhibitory activity over the growth of intracranial gliomas, but at a dose 100-fold higher than the expected for neurostatin [14,15]. The method described in the present report opens the field for the evaluation of neurostatin, and the more potent O-But GD1b, activity under *in-vivo* conditions, as a crucial step before its translation to therapeutic areas.

The biological activity of neurostatin-related glycolipids has been also tested in previous studies of our group to control inflammation. Neurostatin has been shown to control, both *in-vitro* and *in-vivo*, immune cell activation after nervous system injury [16,17], increasing the therapeutic potential of these compounds.

4. Conclusion

In summary, we have described the preparation of eight neurostatin-related compounds by chemical synthesis, providing a reproducible and efficient method to obtain these inhibitory gangliosides. All the synthesized compounds, carrying either acetyl or butyryl O-substitutions, strongly inhibited the division of human and rat glioma lines, with a remarkable effect of the mono-substituted compounds, neurostatin (O-Ac GD1b) and the novel O-But Gd1b, which will permit their use *in-vivo* to inhibit tumor growth.

5. Experimental Protocols

5.1. Chemistry

5.1.1. Chemical synthesis of glycolipid derivatives

Compound **1** (Axxora, Lausen, Switzerland) was chemically modified by the method originally described by Ogura et al. [18] and further modified for gangliosides [12,13]. The modifications consisted of acetylations and butyrylations of compound **1**. O-substitution preferentially occurs in position 9 of the external sialic acid of GD1b. The reaction time and concentration of substituents were previously tested to find the best conditions for obtaining monosubstituted products (Table 1). Compound **1** (125µg; Axxora, Lausen, Switzerland) was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO; 12.5µl) and treated with trimethyl orthoacetate or trimethyl orthobutyrate (TMOA or TMOB; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) in 500-1000 molar excess, in the presence of p-toluensulfonic acid (0.0125mg; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) as catalyst. The reaction mixture was maintained for 8-24 hours in the darkness at 18-21°C (Compounds **2** and **6**) or 23-25°C (Compounds **3**, **4**, **5**, **7**, **8** and **9**) and the reaction stopped by addition of methanol (1ml). The reaction products were desalted by reverse phase chromatography on a C18 Sep-Pak Plus cartridge (Waters, Milford, MA) as described [19]. Briefly, the cartridges were washed successively with 20 ml each of chloroform/methanol (1/2, v/v), methanol and chloroform/methanol/water (3/48/47, v/v/v). The sample was adjusted to the same proportion of chloroform/methanol/water and loaded slowly. After washing with 20 ml of water, the gangliosides were eluted with 20 ml of methanol, concentrated in a speed-vac and stored at -20°C.

5.1.2. Purification of O-acetylated and O-butyrylated compounds

The synthesized compounds (Compounds **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8** and **9**) were purified by preparative thin layer chromatography (TLC) on aluminum plates (20x20 cm), coated with silica gel 60. The reaction products in methanol, were applied to the TLC plates by hand or using a linomat 5 system, together with a standard ganglioside mixture (GT1b, GD1b, GD1a and GM1; Axxora, Lausen, Switzerland). TLCs were developed in Chloroform/Methanol/0,2% CaCl₂ (45/55/10)(v/v/v). The standard gangliosides lane and a lane of reaction mixture were visualized by spraying with 3,5% sulphuric acid in methanol, followed by heating at 120-150°C for 5. After identification of the modified gangliosides by their R_f value (Table 2), the desired bands were scrapped and eluted with methanol (2 hours at 4°C). Silica gel was removed by centrifugation (12.000g, 5minutes at 4°C), followed by chromatography on a Sep-Pak Plus C18 cartridge as described previously, concentrated on a speed-vac and stored at -20°C.

Modified ganglioside concentration was estimated by TLC using ganglioside standards of know concentrations (Compound **1**) and comparing the optical densities of the bands. Alternatively, gangliosides were quantified by analytical high performance thin layer chromatography (HPTLC) on glass plates (10x10cm)

coated with silica gel 60, as preparative TLC. Compounds purity (95%) was assessed as previously described [12].

5.1.3. MALDI-TOF/TOF-MS

The sample was dissolved in 3 μ l of Methanol and mixed with the same volume of matrix (2,5-Dihydroxybenzoic acid 10mg/mL methanol, Sigma Aldrich). This mixture was deposited using the dry droplet method, onto a 384 Opti-TOF 123x81 mm MALDI plate (Applied Biosystems) and allowed to dry at room temperature.

MALDI-MS was performed using a 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems/MDSciex). Spectra were acquired in negative-reflectron mode, under an accelerating potential of 20kV with a Nd:YAG,355nm wavelength laser, at a laser frequency of 200 Hz. In this analysis, signals between m/z 1000 and 3000 were collected using an external calibration method (4700 Cal Mix, Applied Biosystems).

5.1.4. Electrospray-MS

Gangliosides were dissolved in methanol (LCMS grade, Scharlau) and infused into an ion source through an emitter held at a high potential (from -2 to -4.5kV) to form charged droplets.

For electrospray-MS, mass spectra were recorded in negative ion mode on a 4000 QTrap (Applied biosystems/MDSciex) equipped with a Turbo VTM or a NanoSpray[®] II source with ESI probe controlled by Analyst 1.4.2.

Acquisition in EMS scan (500-2000 m/z range) was performed using a declustering potential of -130V and source gas 1 and curtain gas set to 20 and 10 respectively. MS/MS data acquisition (Enhanced Product Ion scan) were performed at a scan rate of 1000amu/s, using the same ionization parameters and applying a collision energy of -45 eV, with a collision energy spread of 5 eV.

5.2. Compound Characterization

5.2.1. Molecular characterization of compounds 2, 3, 4 and 5

The semi-synthetic compounds described in the previous sections were purified, extracted, desalted and quantified, and characterized by MALDI-TOF (Table 6) and Electrospray-MS (Fig. 3, Fig. 4). These methods allowed us to identify both, the molecular weight and the sites of O-acetylation in the compounds.

MALDI-TOF spectra were analyzed taking into consideration the GD1b species and the added substituent (acetyl group, $m/z=43$). MALDI-TOF analysis of compound **2** showed peaks of molecular weight (m/z) corresponding to O-acetylated GD1b with different ceramides. Peaks 1835.88, 1863.91, 1885.32 and 1859.32 corresponded to the sphingosine (LCB) of 18:1 or 20:1 species, with or without a sodium ion (M-H and M+Na-H) respectively (Table 6), as found for compound **1** (GD1b). Compound **3** analysis identified the m/z peaks corresponding to the M-H (LCB 18:1, 20:1) and M+Na-H (LCB 20:1) species with two O-

acetylations. Compound **4** analysis identified the species with three O-acetylations of LCB 18:1 and 20:1, both the M-H and M+Na-H forms. Finally, MALDI-TOF analysis of compound **5** showed the presence of m/z peaks of M-H (LCB 18:1) and M+Na-H (LCB 18:1 and 20:1) with four O-acetylations. In all cases, the observed peaks corresponded to the expected ones.

Analysis of compound **2** ($m/z=939.04$) by Electrospray-MS (Figure 3A) showed that O-acetylation was located mainly on the external sialic acid of the GD1b, as evidenced by the fragmented compound. We obtained a representative peak of one (O-Ac-Neu5Ac α ; $m/z=332.16$) or two sialic acids (O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α ; $m/z=623.28$), bound to the acetyl group (Fig. 3A). Consequently, when the sialic acids were released, two compounds identified as Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[Neu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide ($m/z=1545.84$) and Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide ($m/z=1254.72$) were obtained. As indicated for compound **2**, the analysis of compound **3** ($m/z=960.08$), showed 2 O-acetylations, with one of the acetyl groups located on the external sialic acid (Fig. 3B; $m/z=332.16$) and the second being located in the internal sialic acid, as indicated by the presence O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8 O-Ac-Neu5Ac α ($m/z=665.28$) and O-Acetylated (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-AcNeu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide) ($m/z=1587.92$). The analysis of compound **4** ($m/z=981.20$), with 3 acetylations, indicated that both the internal and the external sialic acids were acetylated ($m/z=332.24$, $m/z=665.44$ and $m/z=1630$), the remaining third substitution located on the sugar chain, as evidenced by O-Acetylated (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide) and O-Acetylated (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-AcNeu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide) ($m/z=1295.92$ and $m/z=1630.00$; Fig. 4A). Finally, analysis of compound **5**, with 4 O-acetylations ($m/z=1002.08$), showed that both sialic acids carried an acetyl group ($m/z=332.08$, $m/z=665.28$, $m/z=1338.80$ and 1671.84), the remaining two groups probably located on the sugar chains of the GD1b structure (Fig. 4B), as indicated by the presence of O-acetylated (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide) ($m/z=1296.72$), bi-O-acetylated (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide) ($m/z=1338.80$) and bi-O-acetylated (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-AcNeu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide) ($m/z=1671.84$).

Taking into consideration the results obtained by MALDI-TOF and Electrospray-MS, we propose that the dynamics of chemical O-acetylation under our conditions, favour the initial substitution of the external and internal sialic acids of the GD1b structure, as previously described [11,13,18]. The third and fourth acetylations occur in the hydroxyl groups of the outer sugar chain (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β), as evidenced by the presence of a non-acetylated Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide ($m/z=888$) in the Electrospray spectra of compounds **4** and **5** (Fig. 3C, 3D), not being located, as additional substitutions, on the sialic acids. Based on this dynamics we report O-acetylated compounds as described on Table 3.

MS (M-H) Calcd for C₈₆H₁₄₈N₄O₄₀ 1879.10; observed (M-H) 1878.23. MS (M-H) Calcd for C₈₈H₁₅₀N₄O₄₁ 1922.10; observed (M-H) 1922.13. MS (M-H) Calcd

for $C_{90}H_{152}N_4O_{42}$ 1965.10; observed (M-H) 1964.12. MS (M-H) Calcd for $C_{92}H_{154}N_4O_{43}$ 2008.10; observed (M-H) 2006.05.

5.2.2. Molecular characterization of compounds 6, 7, 8 and 9

The compounds obtained as described in the experimental section were purified, extracted, desalted, quantified and characterized by MALDI-TOF (Table 6) and Electrospray-MS (Fig. 5, Fig. 6). Using this approach, we identified the molecular weight of the compounds and the sites of O-butyrylations.

MALDI-TOF spectra were analyzed taking into consideration the GD1b species and the substituent (butyryl group, $m/z=70$). MALDI-TOF analysis of compound **6** showed peaks of molecular weight (m/z) corresponding to O-butyrylated GD1b with different ceramides. We identified peak 1934.28 corresponding to the species with a sphingosine 20:1 (M-H; LCB 20:1) and peaks 1929.37 and 1956.23 corresponding to species with a sodium ion and sphingosines 18:1 and 20:1 (M+Na-H; LCB 18:1 and 20:1), respectively (Table 6). Compound **7** analysis showed the m/z peaks corresponding to the M-H (LCB 18:1) and M+Na-H (LCB 18:1 and 20:1) species, with two O-butyrylations. Compound **8** analysis identified species with three O-butyrylations of M-H (LCB 20:1) and the M+Na-H forms (LCB 18:1 and 20:1). Finally, compound **9** MALDI-TOF analysis, showed the presence of the m/z peaks of M-H (LCB 18:1 and 20:1) and M+Na-H (LCB 18:1 and 20:1) with four O-butyrylations on GD1b.

We analyzed also the O-butyrylated compounds by Electrospray-MS (Fig. 5, Fig. 6). Compound **6** ($m/z=952.56$) analysis, indicated that butyrylation was located on the external sialic acid of the ganglioside, as evidenced by the loss of the substituent when the external sialic acid was fragmented (Fig. 5A; $m/z=1544.80$; Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[Neu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide).

Consequently, we obtained peaks both with a butyryl group bound to one sialic acid (Fig. 5A; $m/z=360.16$; O-But-Neu5Ac α and to two sialic acids (Fig. 5A; $m/z=651.28$; O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α). Analysis of compound **7** ($m/z=987.84$), showed that one butyryl group was located on the outer sialic acid, as evidenced by the presence of fragments, $m/z=360.32$, $m/z=651.52$ and $m/z=1614.88$ (O-butyrylated

(Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[Neu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide)). The second substituent was located on the internal sialic acid (Fig. 5B; $m/z=1254.00$; Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide). Similarly to the acetylated compounds, compound **8** ($m/z=1023.28$) had two of its three butyrylations located on the external and internal sialic acids, as indicated by the presence of O-Butyrylated (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-ButNeu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide), O-Butyrylated (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide), O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8O-But-Neu5Ac α and O-But-Neu5Ac α ($m/z=1684.96$, $m/z=1324.00$, $m/z=721.60$, $m/z=360.32$, respectively), the remaining third O-Butyrylation located on the external sugar chains (Fig. 6A), as evidenced by m/z peaks of 1324.00 and 651.44, corresponding to O-But (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide) and O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α , respectively, and a non-acetylated Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide ($m/z=888.96$) peak. Finally, compound **9** ($m/z=1058$) had one butyryl group in the external sialic acid (Bi-O-Butyrylated (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-

ButNeu5Ac α 2 \rightarrow 3]Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide; m/z =1755.04 and O-But-Neu5Ac α ; m/z =360.32), one in the internal sialic acid (Bi-O-Butyrylated (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide); m/z =1394.16, O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8O-But-Neu5Ac α ; m/z =721.52) and the other two O-Butyrylated residues probably on the sugar chain Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β , as evidenced by peaks of m/z =888.96 and m/z =1394.16.

The MALDI-TOF and Electrospray-MS results indicate the dynamics of chemical O-butyrylation that, under our conditions, favour an initial substitution on the external and internal sialic acids of the GD1b, as previously described [13,18]. The third and fourth acetylations occurred on the hydroxyl groups of the outer sugar chain (Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β), as evidence by the presence of a non-acetylated peak of Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide (m/z =888) in the electrospray spectra of compounds 8 and 9 (Fig. 6A, 6B), not located as additional substitutions on the sialic acids. Based on this dynamics we described the O-butyrylated compounds as stated on Table 3.

MS (M-H) Calcd for C₉₀H₁₅₆N₄O₄₀ 1934.00; observed (M-H) 1934.28. MS (M-H) Calcd for C₉₂H₁₅₈N₄O₄₁ 1976.10; observed (M-H) 1977.12. MS (M-H) Calcd for C₉₈H₁₆₈N₄O₄₂ 2074.00; observed (M-H) 2075.21. MS (M-H) Calcd for C₁₀₀H₁₇₀N₄O₄₃ 2116.10; observed (M-H) 2116.26.

5.3. Alkaline hydrolysis

To assess the differential resistance to alkaline hydrolysis, compounds 2 and 6 were incubated for 5 and 20 minutes at 24 °C in methanolic NaOH (10mM NaOH in methanol). After neutralization with acetic acid (10mM in methanol), the recovered compounds were purified as previously stated and identified by analytical HPTLC. The hydrolysis rate was calculated as the percent GD1b band optical density.

5.4. Inhibition of cell proliferation

Rat glioma (C6 line) and human astrocytoma (U373-MG line) cells, were maintained in DMEM complete medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), supplemented with fetal bovine serum (FBS, 10%; GLinus, Madrid, Spain), glutamine (2mM), penicillin (50IU/ml) and streptomycin (50 μ g/ml), at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Exponentially growing C6 or U373-MG cells were seeded on 96-well plates (Beckton Dickinson, Le Pont de Claix, France), in complete DMEM medium, at a density of 5x10³ cells/well. The cells were allowed to attach for 6 hours, then the medium was replaced by serum-free DMEM medium and incubation was continued for 36 hours. The cells were treated with serial dilutions of semi-synthetic compounds in DMEM, supplemented with EGF (10ng/ml) for 24 hours. As an additional non-gangliosidic control, we used the drug Temozolomide (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), for its well documented antitumoral activity [20,21]

Cell proliferation was evaluated with a MTT assay (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), based on the conversion of the water soluble 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) into an insoluble formazan. Briefly, the cells

were treated for 4 hours at 37°C with MTT in RPMI 1640 (0.5 µg/µl; without phenol red; Sigma-Aldrich, St Louis, MO), the precipitated formazan was dissolved in SDS (0.1 g/ml in 0.01M HCl; 4-18 hours) and the solution optical density measured at 595nm. Absorption values were referred to positive proliferation controls, cultured in DMEM medium supplemented with EGF. Inhibition was expressed as an ID₅₀ value, the compound concentration that reduced maximal proliferation by 50% (Fig. 7).

Acknowledgment: This work was supported by grants from the “Inocente-Inocente” and FUHNPAIIN Foundations and from the Spanish Department of Ciencia e Innovación (SAF 2006-11224). We thank Gemma Barroso for technical help with MALDI-TOF and electrospray-MS spectra. We thank Jesus Díaz Tobarra for technical help.

Figure Captions

Figure 1. Migration on TLC of semi-synthetic acetylated compounds. Using the different reaction conditions, we obtained various mixtures of compounds (**A**, **B**, **C**: 18, 21 and 25°C respectively). Compound polarity decreased as the number of substitutions increased, producing at least 4 different GD1b-derived compounds (Compounds **2-5**).

Figure 2. Migration on TLC of semi-synthetic butyrylated compounds. Using the different reaction conditions, we obtained various mixtures of compounds (**A**, **B**, **C**: 18, 21 and 25°C respectively). Compound polarity decreased as the number of substitutions was increased, producing at least 4 different GD1b-derived compounds (Compounds **6-9**).

Figure 3. Electrospray-MS characterization of acetylated compounds (2, 3). From A to B, Electrospray-MS spectra of compounds **2** and **3** respectively. All spectra were obtained from the compounds derived from the 18:1 GD1b. The m/z values are indicated for every peak.

Figure 4. Electrospray-MS characterization of acetylated compounds (4, 5). From A to B, Electrospray-MS spectra of compounds **4** and **5** respectively. All spectra were obtained from the compounds derived from the 18:1 GD1b. The m/z values are indicated for every peak.

Figure 5. Electrospray-MS characterization of butyrylated compounds (6, 7). From A to B, Electrospray-MS spectra of compounds **6** and **7** respectively. All spectra were obtained from the compounds derived from the 18:1 GD1b. The m/z values are indicated for every peak.

Figure 6. Electrospray-MS characterization of butyrylated compounds (8, 9). From A to B. Electrospray-MS spectra of compounds **8** and **9** respectively. All

spectra were obtained from the compounds derived from the 18:1 GD1b. The m/z values are indicated for every peak.

Figure 7. Inhibition of proliferation of U373MG and C6 cells by compounds 2-9. Dose-response inhibition curves for the semi-synthetic compounds (2-9), using EGF as mitogen (t=24h). (A, B) Effect of compounds 2-5 (A) or 6-9 (B) on the proliferation of the U373MG human astrocytoma cell line. (C, D) Effect of compounds 2-5 (C) or 6-9 (D) on the proliferation of the C6 rat glioblastoma cell line. The compounds were assayed as serial dilutions (5-0.17 μ M).

References

1. O. O. Kanu, A. Mehta, C. Di, N. Lin, K. Bortoff, D. D. Bigner, H. Yan, and D. C. Adamson, Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets, *Expert. Opin. Ther. Targets*. 13 (2009) 701-718.
2. H. Friedman, What is "hope" for a patient with a deadly brain tumor?, *Cerebrum: The DANA Forum on Brain Science* 5 (2003) 7-18.
3. S. Hakomori and Y. Igarashi, Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling, *J. Biochem.* 118 (1995) 1091-1103.
4. K. Iwabuchi, S. Yamamura, A. Prinetti, K. Handa, and S. Hakomori, GM3-enriched microdomain involved in cell adhesion and signal transduction through carbohydrate-carbohydrate interaction in mouse melanoma B16 cells, *J. Biol. Chem* 273 (1998) 9130-9138.
5. E. A. Miljan, E. J. Meuillet, B. Mania-Farnell, D. George, H. Yamamoto, H. G. Simon, and E. G. Bremer, Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides, *J. Biol. Chem* 277 (2002) 10108-10113.
6. S. Hakomori, S. Yamamura, and A. K. Handa, Signal transduction through glyco(sphingo)lipids. Introduction and recent studies on glyco(sphingo)lipid-enriched microdomains, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 845 (1998) 1-10.
7. M. Zervas and S. U. Walkley, Ferret pyramidal cell dendritogenesis: changes in morphology and ganglioside expression during cortical development, *J. Comp Neurol.* 413 (1999) 429-448.
8. A. Varki, Diversity in the sialic acids, *Glycobiology* 2 (1992) 25-40.
9. K. Furuhashi, Chemistry of N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac), *Trends Glycosci Glycotech* 16 (2004) 146-169.
10. J. Abad-Rodriguez, M. Vallejo-Cremades, and M. Nieto-Sampedro, Control of glial number: purification from mammalian brain extracts of an inhibitor of astrocyte division, *Glia* 23 (1998) 156-168.

11. J. Abad-Rodriguez, M. Bernabe, L. Romero-Ramirez, M. Vallejo-Cremades, A. Fernandez-Mayoralas, and M. Nieto-Sampedro, Purification and structure of neurostatin, an inhibitor of astrocyte division of mammalian brain, *J. Neurochem.* 74 (2000) 2547-2556.
12. L. Romero-Ramirez and M. Nieto-Sampedro, Inhibiting human astrocytoma growth: structure-activity relationships in neurostatin related glycolipids, *J. Med. Chem* 47 (2004) 4983-4984.
13. U. Hubl, H. Ishida, M. Kiso, A. Hasegawa, and R. Schauer, Studies on the specificity and sensitivity of the influenza C virus binding assay for 9-O-acetylated sialic acids and its application to human melanomas, *J. Biochem.* 127 (2000) 1021-1031.
14. F. F. Santos-Benito, A. Fernandez-Mayoralas, M. Martin-Lomas, and M. Nieto-Sampedro, Inhibition of proliferation of normal and transformed neural cells by blood group-related oligosaccharides, *J. Exp. Med.* 176 (1992) 915-918.
15. M. Nieto-Sampedro, C. Bailon, A. Fernandez-Mayoralas, M. Martin-Lomas, B. Mellstrom, and J. R. Naranjo, Experimental brain glioma: growth arrest and destruction by a blood-group-related tetrasaccharide, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55 (1996) 169-177.
16. D. Gomez-Nicola, B. Valle-Argos, M. Suardiaz, J. S. Taylor, and M. Nieto-Sampedro, Role of IL-15 in spinal cord and sciatic nerve after chronic constriction injury: regulation of macrophage and T-cell infiltration, *J. Neurochem.* 107 (2008) 1741-1752.
17. D. Gomez-Nicola, B. Valle-Argos, and M. Nieto-Sampedro, Blockade of IL-15 activity inhibits microglial activation through the NFkappaB, p38, and ERK1/2 pathways, reducing cytokine and chemokine release, *Glia* 2009).
18. H. Ogura, K. Furuhashi, S. Sato, K. Anazawa, M. Itoh, and Y. Shitori, Synthesis of 9-O-acyl- and 4-O-acetyl-sialic acids, *Carbohydr. Res.* 167 (1987) 77-86.
19. M. A. Williams and R. H. McCluer, The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides, *J. Neurochem.* 35 (1980) 266-269.
20. T. Kanzawa, I. M. Germano, Y. Kondo, H. Ito, S. Kyo, and S. Kondo, Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide, *Br. J. Cancer* 89 (2003) 922-929.
21. M. F. Stevens, J. A. Hickman, S. P. Langdon, D. Chubb, L. Vickers, R. Stone, G. Baig, C. Goddard, N. W. Gibson, J. A. Slack, and ., Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine, *Cancer Res.* 47 (1987) 5846-5852.

Table 1. Efficiency of different O-Acetylation conditions.

		TMOA molar excess	
		500	1000
Reaction time (hours)	48	2%	4%
	24	7%	3%
	16	10%	— ^a
	8	41%	— ^a

a) (—), not determined.

Table 2. Retention factor on TLC of semi-synthetic compounds.

Compound	Rf
1	0,195±0,019
2	0,284±0,014
3	0,329±0,024
4	0,479±0,073
5	0,623±0,083
6	0,357±0,052
7	0,427±0,072
8	0,688±0,079
9	0,793±0,099

Table 3. Summary of the Neurostatin-related compounds obtained by chemical synthesis.

Ganglioside		Carbohydrate sequence^a
1	GD1b	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide
2	O-AcGD1b	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide
3	Bi-O-AcGD1b	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide
4	Tri-O-AcGD1b	O-Ac-Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide
5	Tetra-O-AcGD1b	O-Ac-Gal β 1 \rightarrow 3O-Ac-GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-Ac-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide
6	O-ButGD1b	Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide
7	Bi-O-ButGD1b	O-But-Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8Neu5Ac α 2 \rightarrow 3] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide
8	Tri-O-ButGD1b	O-But-Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide
9	Tetra-O-ButGD1b	O-But-Gal β 1 \rightarrow 3O-But-GalNAc β 1 \rightarrow 4[O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 8(O-But-Neu5Ac α 2 \rightarrow 3)] Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1'-ceramide

a) Gal=D-galactose; Glc=D-glucose; GalNAc=D-galactosamine; Neu5Ac=N-acetylneuraminic acid.

Table 4. Inhibitory activity (ID_{50} , μM) of O-acetylated (**2-5**) and O-butyrylated (**6-9**) compounds on the U373MG human astrocytoma and C6 rat glioma cell lines.

Compound ^a	ID_{50} (μM) on U373 cells ^b	ID_{50} (μM) on C6 cells ^b
TMZ ^c	401,20 \pm 15,30	434,92 \pm 18,65
1	>50	>50
2	2,00 \pm 0,45	0,23 \pm 0,12
3	2,54 \pm 0,41	1,65 \pm 0,35
4	2,97 \pm 0,52	3,56 \pm 0,74
5	2,93 \pm 0,49	4,01 \pm 0,56
6	0,83 \pm 0,34	0,32 \pm 0,17
7	1,50 \pm 0,46	1,31 \pm 0,39
8	2,46 \pm 0,52	1,74 \pm 0,44
9	2,57 \pm 0,59	1,88 \pm 0,61

- a) All O-acetylated and O-butyrylated compounds were generated from ganglioside GD1b (compound 1).
- b) EGF was used as mitogen for human U373MG or rat C6 cells. Data are expressed as mean \pm SD of ID_{50} of four experiments performed in quadruplicate.
- c) As additional non-gangliosidic control inhibitory compound we used temozolomide (TMZ).

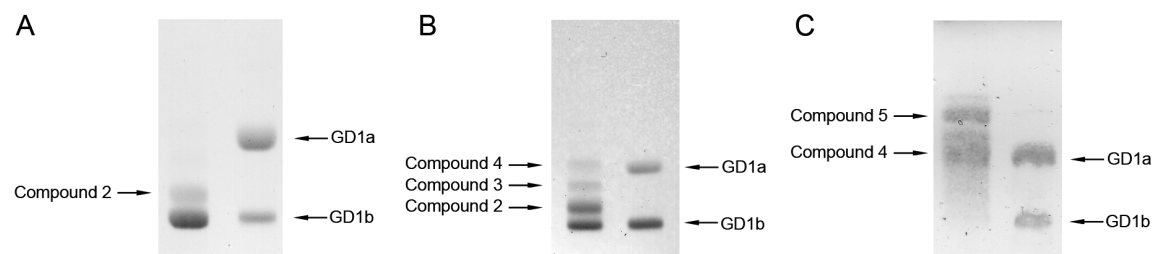
Table 5. Compounds **2** and **6** resistance to alkaline hydrolysis.

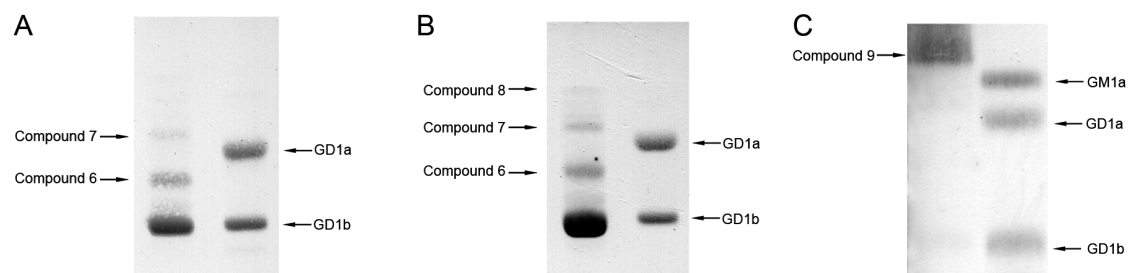
Compound	Hydrolysis Rate (5min)	Hydrolysis Rate (20min)
2	11,35%	41,46%
6	—	8,65%

Table 6. MALDI-TOF-TOF of GD1b derived compounds.

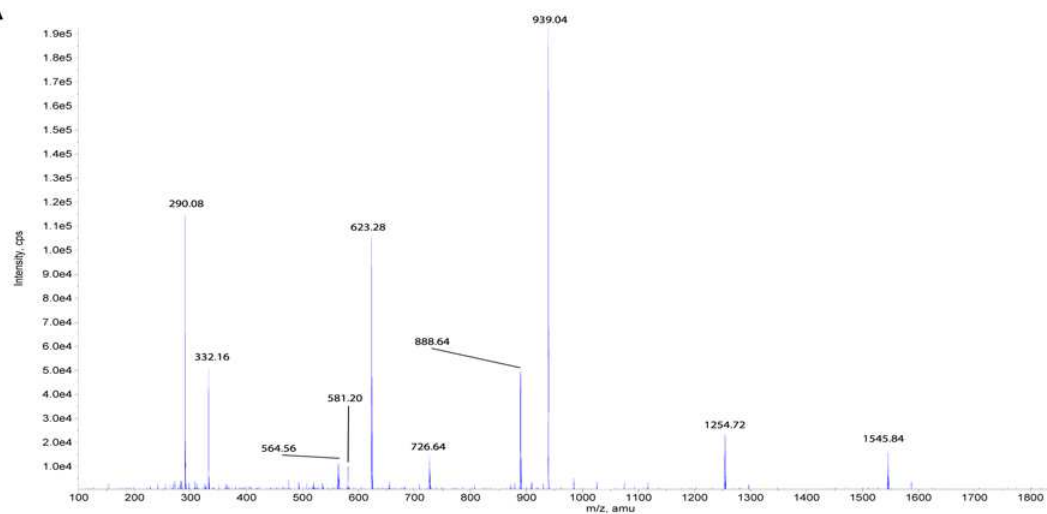
COMPOUND ^a	MALDI-TOF PEAKS	
	M-H	M+Na-H
1. GD1b	1835.88 (18:1) 1863.91 (20:1)	1859.32 (18:1) 1885.88 (20:1)
2. O-AcGD1b	1878.23 (18:1) 1905.25 (20:1)	1900.22 (18:1) 1928.26 (20:1)
3. Bi-O-AcGD1b	1922.13 (18:1) 1950.15 (20:1)	1972.12 (20:1)
4. Tri-O-AcGD1b	1964.12 (18:1) 1992.15 (20:1)	1986.02 (18:1) 2014.12 (20:1)
5. Tetra-O-AcGD1b	2006.05 (18:1)	2030.02 (18:1) 2056.05 (20:1)
6. O-ButGD1b	1934.28 (20:1)	1929.37 (18:1) 1956.23 (20:1)
7. Bi-O-ButGD1b	1977.12 (18:1)	2000.21 (18:1) 2028.34 (20:1)
8. Tri-O-ButGD1b	2075.21 (20:1)	2068.15 (18:1) 2098.24 (20:1)
9. Tetra-O-ButGD1b	2116.26 (18:1) 2144.27 (20:1)	2138.21 (18:1) 2166.25 (20:1)

- a) TLC purified compounds were analyzed by MALDI-TOF-TOF, obtaining the described mass peaks, corresponding to the expected species. The analysis of compound **1** showed a mixture of 18:1 and 20:1 derived ceramides, pattern observed also in the compound **1** derived products.

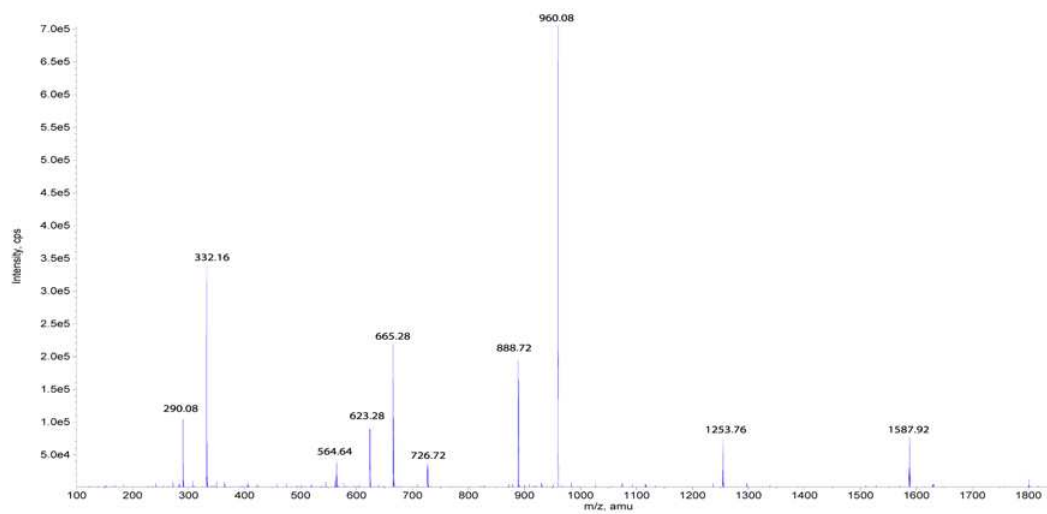




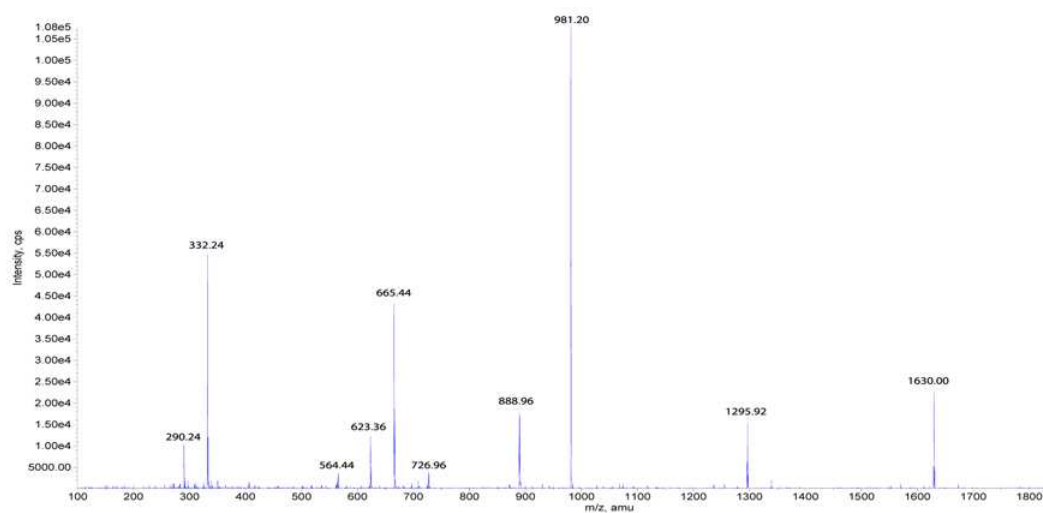
A



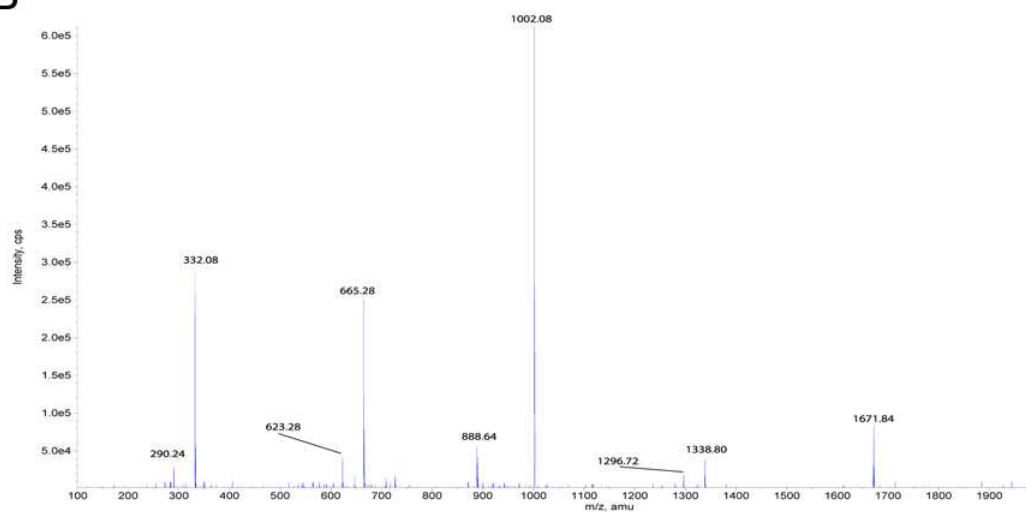
B



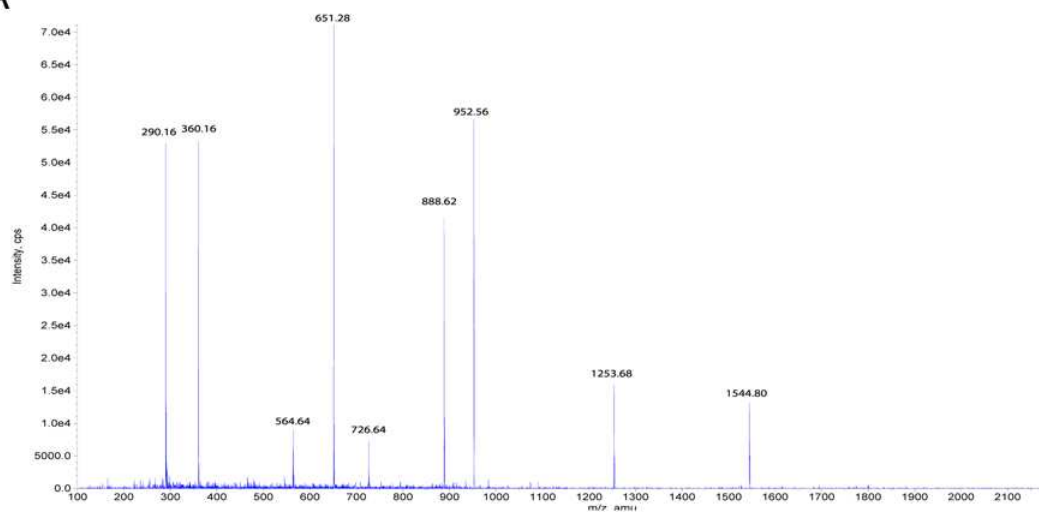
A



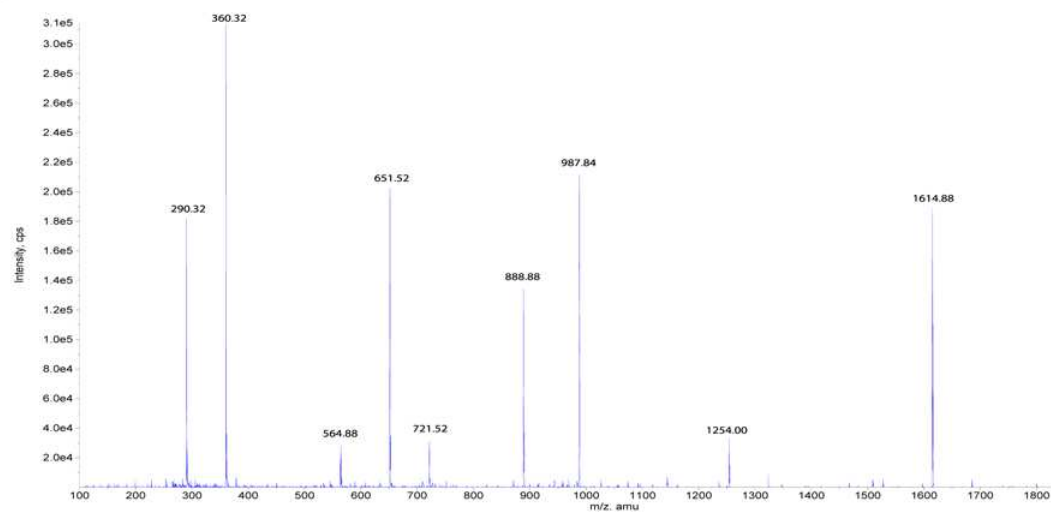
B

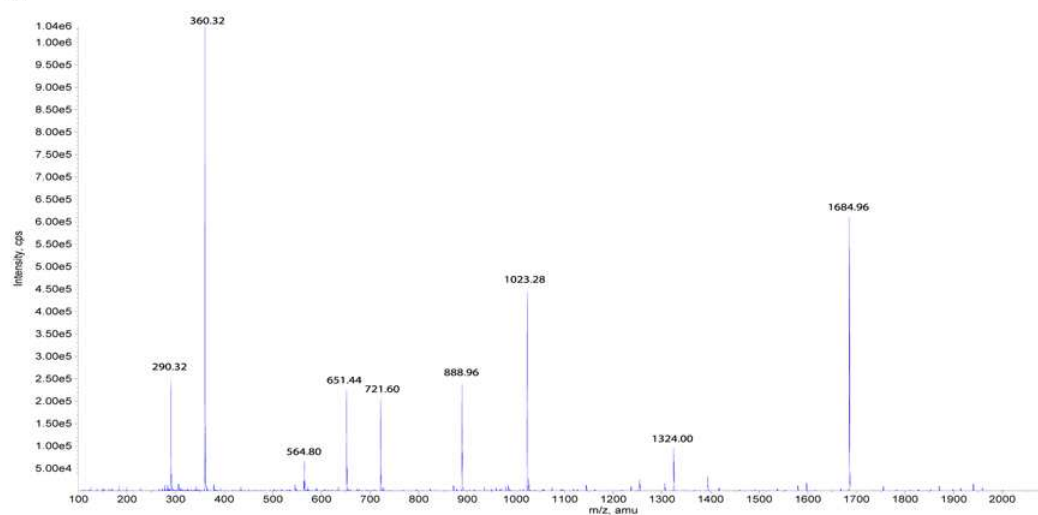
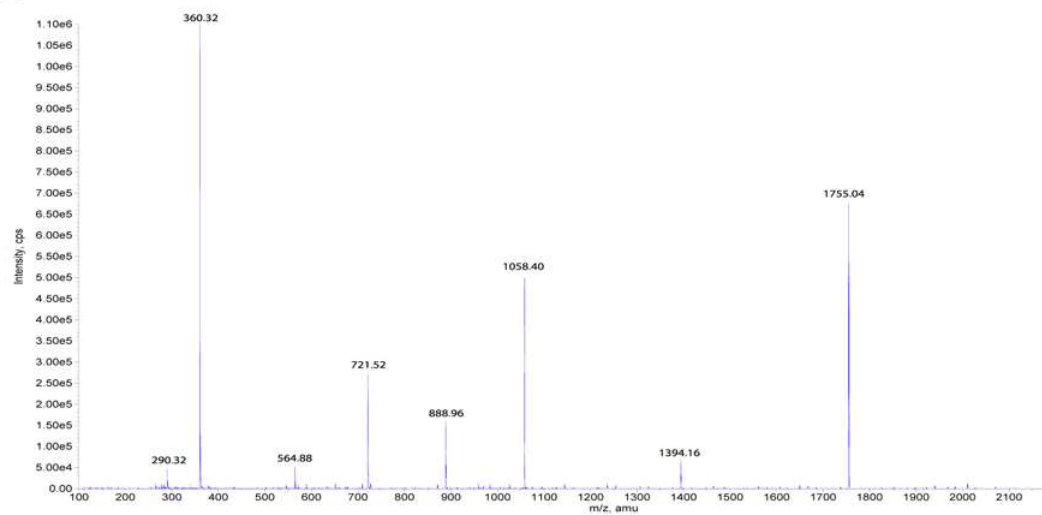


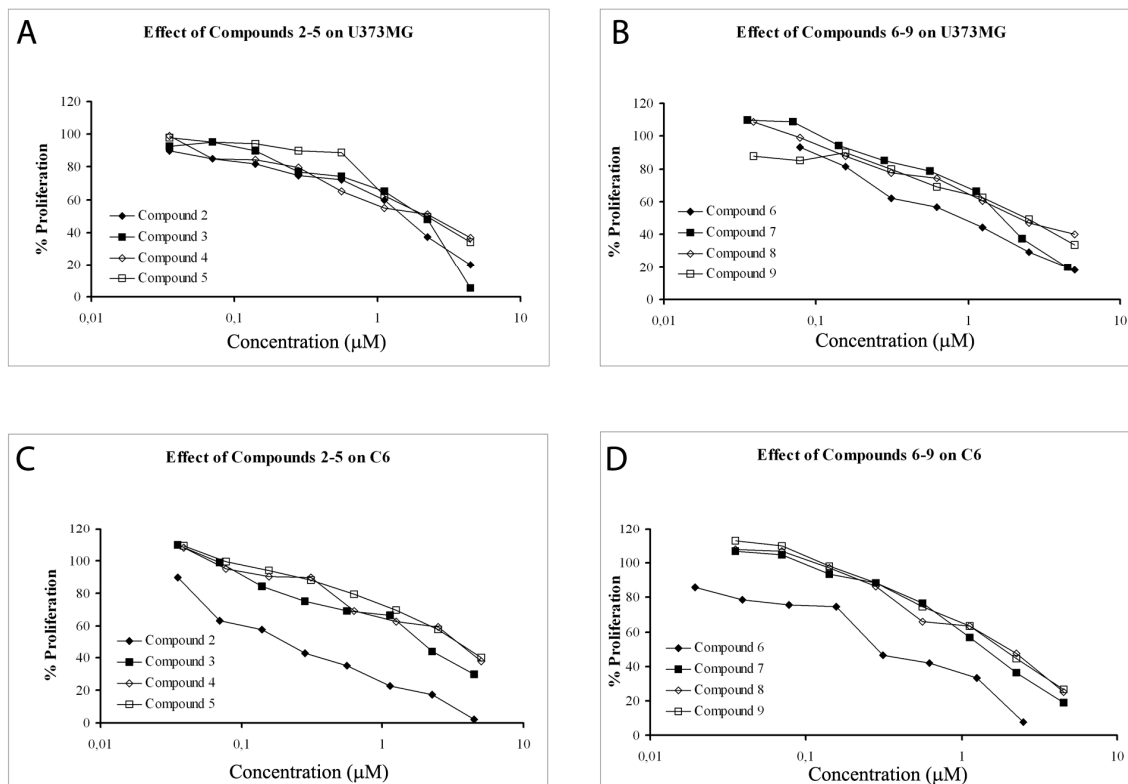
A



B



A**B**



Interleukin 15 Expression in the CNS: Blockade of Its Activity Prevents Glial Activation After an Inflammatory Injury

DIEGO GÓMEZ-NICOLA,^{1,2} BEATRIZ VALLE-ARGOS,¹ D. WOLFGANG PITA-THOMAS,¹
AND MANUEL NIETO-SAMPEDRO^{1,2*}

¹Functional and Systems Neurobiology Department, Cajal Institute, CSIC, Madrid, Spain

²Experimental Neurology Unit, Hospital Nacional de Paraplégicos, Finca La Peraleda s/n, Toledo, Spain

KEY WORDS

cytokines; IL-15; inflammation; lipopolysaccharide; microglia; astrocytes

ABSTRACT

Although reactive glia formation after neuronal degeneration or traumatic damage is one of the hallmarks of central nervous system (CNS) injury, we have little information on the signals that direct activation of resting glia. IL-15, a pro-inflammatory cytokine involved in regulating the response of T and B cells, may be also key for the regulation of early inflammatory events in the nervous system. IL-15 was expressed in the CNS, most abundantly in cerebellum and hippocampus, mainly in astrocytes and in some projection neurons. Using a rodent model of acute inflammatory injury [lipopolysaccharide (LPS) injection], we found enhanced expression of IL-15 in both reactive astroglia and microglia, soon after CNS injury. Blockade of IL-15 activity with an antibody to the cytokine, reversed activation of both glial types, suggesting that IL-15 has a major role in the generation of gliotic tissue and in the regulation of neuroimmune responses. Because IL-15 appears to modulate the inflammatory environment acutely generated after CNS injury, regulating IL-15 expression seems a clear anti-inflammatory therapy to improve the outcome of neurodegenerative diseases and CNS trauma. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Tissue damage after central nervous system (CNS) trauma or autoimmune disease is modulated by cytokines, growth factors and other homeostatic molecules, that determine the evolution and final functional outcome of these deleterious events. Those molecules are produced in neural tissue, contributing to macrophage and T-cell infiltration, activation and proliferation, and leading to CNS inflammation, a state common to many pathologies of unrelated etiology. CNS inflammation is maintained and made chronic by the concomitant action of resident astrocytes and microglia, that become reactive, the inflammatory cytokines they produce and the accompanying neuronal death (reviewed by Bauer et al., 2001; Schroeter and Jander, 2005). The inflammatory agents produced by reactive glia include tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β), and nitric oxide (Chao et al., 1992; Giulian and Baker, 1986; Kim and de

Vellis, 2005; Sawada et al., 1989; Watkins and Maier, 2002). Additionally, microglia are the major regulators of both innate and adaptative immune responses and specialized antigen presenting cells (APC) in the CNS (Aloisi, 2001).

The production of T-cell cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, and IL-10), is a most important adaptative immune response, after CNS damage. The main T-cell mitogen is interleukin-2 (IL-2), which stimulates the production of its twin brother, interleukin-15 (IL-15; Hanisch and Quirion, 1996; Smith, 1992). Like IL-2, IL-15 is a 4- α -helix bundle cytokine acting as B cell co-mitogen and T cell proliferation enhancer (Armitage et al., 1995; Carson et al., 1994). The receptors for IL-15 (IL-15R) and IL-2 share subunits β and γ , subunit α remaining cytokine-specific (Giri et al., 1995; Grabstein et al., 1994). IL-15R is found in both membranes and nuclei (Dubois et al., 1999; Pereno et al., 2000). This dual location, together with the existence of intracellular and secreted IL-15 isoforms (Gaggero et al., 1999; Kurys et al., 2000), establishes a complex autocrine and paracrine IL-15 signaling network (Nishimura et al., 2005). Furthermore, whereas IL-2 production is restricted to lymphocytes, IL-15 expression is pleiotropic, occurring in tissues ranging from skin to CNS (Budagian et al., 2006). The expression of IL-15 and IL-15R has been described in murine brain and cerebellum (Hanisch et al., 1997), as well as in fetal human brain (Kurowska et al., 2002). It has also been studied in cultured astrocytes and neural cell lines (Satoh et al., 1998), as well as in microglia (Hanisch et al., 1997), the latter regulated by IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ (Lee et al., 1996). Although these studies provide information on regional and cellular IL-15 expression, a more detailed study of all its sources, and its role in pathological conditions could help to understand better the functions of IL-15 in the CNS.

Previously, we reported that ganglioside GD3 regulated the IL-15/IL-15R system in murine microglia, lead-

Grant sponsors: Inocente-Inocente Foundation, FUHNPAIIN Foundations, Spanish Department of Education and Science.

*Correspondence to: Manuel Nieto-Sampedro, Neural Plasticity Group, Cajal Institute (CSIC), Avda. Doctor Arce 37, 28002 Madrid, Spain. E-mail: mns@cajal.csic.es

Received 8 October 2007; Accepted 5 December 2007

DOI 10.1002/glia.20628

Published online 31 January 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Role of IL-15 in spinal cord and sciatic nerve after chronic constriction injury: regulation of macrophage and T-cell infiltration

D. Gómez-Nicola,^{*,†} B. Valle-Argos,^{*} M. Suardíaz,[‡] J. S. Taylor[‡] and M. Nieto-Sampedro^{*,†}

^{*}Cajal Institute, Madrid, Spain

[†]Experimental Neurology Unit, Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo, Spain

[‡]Sensorimotor Function Lab, Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo, Spain

Abstract

The release of inflammatory mediators from immune and glial cells either in the peripheral or CNS may have an important role in the development of physiopathological processes such as neuropathic pain. Microglial, then astrocytic activation in the spinal cord, lead to chronic inflammation, alteration of neuronal physiology and neuropathic pain. Standard experimental models of neuropathic pain include an important peripheral inflammatory component, which involves prominent immune cell activation and infiltration. Among potential immunomodulators, the T-cell cytokine interleukin-15 (IL-15) has a key role in regulating immune cell activation and glial reactivity after CNS injury. Here we show, using the model of chronic constriction of the sciatic nerve (CCI), that IL-15 is essential for the development of the early inflammatory events

in the spinal cord after a peripheral lesion that generates neuropathic pain. IL-15 expression in the spinal cord was identified in both astroglial and microglial cells and was present during the initial gliotic and inflammatory (NFκB) response to injury. The expression of IL-15 was also identified as a cue for macrophage and T-cell activation and infiltration in the sciatic nerve, as shown by intraneural injection of the cytokine and activity blockage approaches. We conclude that the regulation of IL-15 and hence the initial events following its expression after peripheral nerve injury could have a future therapeutic potential in the reduction of neuroinflammation.

Keywords: astrocytes, cytokines, inflammation, microglia, neuropathic pain, NFκB.

J. Neurochem. (2008) **107**, 1741–1752.

The inflammatory mediators that contribute to the development of neuropathic pain, are also essential for the activation of glia following CNS injury and their release is crucial to neuropathic pain generation (DeLeo and Yezierski 2001; Zimmermann 2001; Watkins and Maier 2002). Spinal glial activation is a common corollary of peripheral injury, observed following partial sciatic injury (Coyle 1998), formalin injection (Fu *et al.* 1999), spinal nerve ligation (Jin *et al.* 2003), or sciatic nerve inflammation (Ledeboer *et al.* 2005b). There is an activation of inflammatory cascades like the p38 MAPK (Kim *et al.* 2002; Obata *et al.* 2004), leading to the production of inflammatory mediators (Hua *et al.* 1999; Svensson *et al.* 2003) involved in central sensitization of spinal neurons (Minami *et al.* 1999; Samad *et al.* 2001; Ji *et al.* 2003; Hains and Waxman 2006). Cytokine production in neuropathic pain models is partially mediated by NFκB activation

in the spinal cord (Ledeboer *et al.* 2005a), where and effective approach to reduce CCI-induced allodynia and hyperalgesia has been observed following blockage of its activity (Sun *et al.* 2006).

Infiltration of neural tissue by immune cells, with active production of cytokines like interleukin-1β (IL-1β, TNF-α, or IL-6 (Okamoto *et al.* 2001), contribute to neuropathic pain chronification (Hu and McLachlan 2002; Moalem *et al.* 2004; Sommer and Kress 2004), sensitizing or damaging

Received September 3, 2008; revised manuscript received October 14, 2008; accepted October 14, 2008.

Address correspondence and reprint requests to Manuel Nieto Sampedro, Cajal Institute, Avda. Doctor Arce, 37, 28002 Madrid, Spain. E-mail: mns@cajal.csic.es

Abbreviations used: IL-15, interleukin-15; NFκB, nuclear factor κB; PBS, phosphate-buffered saline.

Blockade of IL-15 Activity Inhibits Microglial Activation Through the NF κ B, p38, and ERK1/2 Pathways, Reducing Cytokine and Chemokine Release

DIEGO GOMEZ-NICOLA,¹ BEATRIZ VALLE-ARGOS,² AND MANUEL NIETO-SAMPEDRO^{1,2*}

¹Experimental Neurology Unit, Hospital Nacional de Paraplégicos, 45071, Toledo, Spain

²Functional and Systems Neurobiology Department, Neural Plasticity Group, Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28002, Madrid, Spain

KEY WORDS

inflammation; MAPKs; IL-15 knockout mice; gliosis; neurostatin; antibody arrays

ABSTRACT

Reactive glia formation is one of the hallmarks of damage to the CNS, but little information exists on the signals that direct its activation. Microglial cells are the main regulators of both innate and adaptive immune responses in the CNS. The proinflammatory cytokine IL-15 is involved in regulating the response of T and B cells, playing a key role in regulating nervous system inflammatory events. We have used a microglial culture model of inflammation induced by LPS and IFN γ to evaluate the role of IL-15 in the proinflammatory response. Our results indicate that IL-15 is necessary for the reactive response, its deficiency (IL-15^{-/-}) leading to the development of a defective proinflammatory response. Blockade of IL-15, both with blocking antibodies or with the ganglioside Neurostatin, inhibited the activation of the NF κ B pathway, decreasing iNOS expression and NO production. Inhibiting IL-15 signaling also blocked the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways ERK1/2 and p38. The major consequence of these inhibitory effects, analyzed using cytokine antibody arrays, was a severe decrease in the production of chemokines, cytokines and growth factors, like CCL17, CCL19, IL-12, or TIMP-1, that are essential for the development of the phenotypic changes of glial activation. In conclusion, activation of the IL-15 system seems a necessary step for the development of glial reactivity and the regulation of the physiology of glial cells. Modulating IL-15 activity opens the possibility of developing new strategies to control gliotic events upon inflammatory stimulation. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Interleukin 15 (IL-15) is a member of the four- α -helix bundle cytokine family with elevated homology with IL-2 and IL-21 that acts as mitogen for natural killer (NK), B and T cells (Armitage et al., 1995; Carson et al., 1994; Fehniger and Caligiuri, 2001; Grabstein et al., 1994). IL-15 is expressed in organs ranging from skin to the central nervous system (CNS) (Budagian et al., 2006), being preferentially expressed by macrophages (Doherty et al., 1996). IL-15 stimulates the proliferation, activation or survival of various immune cells (Bulfone-Paus

et al., 1997; Carson et al., 1994; Kanegane and Tosato, 1996). The importance of this cytokine for immune function was evidenced by the defects in NK and memory CD8 T cell populations observed in IL-15^{-/-} mice (Kennedy et al., 2000). IL-15 is expressed in murine brain and cerebellum (Gomez-Nicola et al., 2008a; Hanisch et al., 1997), regulating astrocytic, microglial and neural functions (Gomez-Nicola et al., 2006, 2008b; Hanisch et al., 1997; Lee et al., 1996; Satoh et al., 1998). It can regulate neuroimmune responses by regulating T-cell and macrophage infiltration and activation in the early stages after nerve injury (Gomez-Nicola et al., 2008b; Huang et al., 2007). IL-15 expression occurs in immunological disorders (Fehniger and Caligiuri, 2001) such as multiple sclerosis (MS) or rheumatoid arthritis (RA) and the use of IL-15 activity neutralizing strategies is an efficient anti-inflammatory approach (Baslund et al., 2005; Ruchatz et al., 1998).

The IL-15 receptor complex is formed by three subunits (IL-15R α , IL-2R β , γ_c ; Giri et al., 1995; Grabstein et al., 1994) and is found in both cell membranes and nuclei (Dubois et al., 1999; Pereno et al., 2000). This receptor variability, together with the existence of intracellular and secreted IL-15 isoforms (Gaggero et al., 1999; Kurys et al., 2000), generates a complex autocrine and paracrine IL-15 signaling network (Nishimura et al., 2005). Intracellular IL-15 signaling occurs through the JAK-STAT pathway, preferentially using JAK1 and JAK3 isoforms (Moutoussamy et al., 1998), leading to NFAT (nuclear factor of activated T cells) and NF κ B (nuclear factor κ B) activation, involving the expression of several key proinflammatory molecules (Eicher, 2003; Giron-Michel et al., 2003; O'Neill and Kaltschmidt, 1997).

The vast majority of the extracellular immune stimuli are transduced by the MAPKs (mitogen-activated pro-

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación; Grant number: SAF 2006-11224; Grant sponsors: "Inocente-Inocente", FUHNPAIIIN Foundations.

*Correspondence to: Manuel Nieto Sampedro, Neural Plasticity Group, Cajal Institute, Avda. Doctor Arce, 37, 28002 Madrid, Spain. E-mail: mns@cajal.csic.es

Received 11 March 2009; Accepted 26 June 2009

DOI 10.1002/glia.20920

Published online 16 July 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).